



Departamento de Bioquímica

TESIS DOCTORAL:

Regulación epigenética mediada por Polycomb
en las células madre hematopoyéticas y su nicho

Isabel Hidalgo Gavilán

Madrid, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Regulación epigenética mediada por
Polycomb en las células madre
hematopoyéticas y su nicho

Memoria presentada por
Isabel Hidalgo Gavilán,
Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos,
Para optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, 2015

Directora de Tesis
Susana González López
Tutora de Tesis
Carmela Calés Bourdet

Memoria realizada en
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)





MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TESIS

Susana González López, Doctora en Ciencias y Jefa de Grupo en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares en Madrid,
CERTIFICA: Que **Isabel Hidalgo Gavilán**, licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Granada, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título: **“Regulación epigenética mediada por Polycomb en las células madre hematopoyéticas y su nicho”**.

Revisado este trabajo, el que suscribe lo considera satisfactorio y autoriza su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en:

Madrid a 10 de Junio de 2015.

Fdo: Susana González López

Agradecimientos

Son muchos los días durante la etapa de escritura en los que pienso en el momento de sentarme con los agradecimientos, nunca sé si será la parte más difícil porque hay mucha gente a quién le debo esta tesis, o si será la parte más fácil por la misma razón.

No soy de aquellas personas que siempre han tenido clara una vocación, más bien he ido cambiando de aspiraciones y por otro lado consiguiéndolas, de lo cual me siento tan orgullosa como agradecida, ya que sin muchos apoyos ninguna de ellas hubiera sido posible. Así que en primer lugar quería dar las gracias a mi directora Susana, ya que cuando llegué aquí sin tener muy claro en qué consistía este mundo, me abrió las puertas y me brindó la oportunidad de seguir hasta hoy dándome tanto las herramientas como la confianza en mí misma necesaria para continuar.

Tengo muchísimo que agradecer a todos mis compañeros del labo, los que están y los que estuvieron. Gracias por todo lo que he aprendido de profesionales como Lorena o Ileana, las que ya llevaban más tiempo en ciencia en el momento en que nos encontramos, ha sido un placer trabajar con vosotras, escuchar vuestros consejos y conoceros a las dos.

Gracias a Rebeca, eres la trabajadora más incansable que conozco, estoy encantadísima de haber compartido estos años contigo (y con las historias de tus hijas, y las historias de los de atletismo, en fin, mil historias que nadie contará nunca como tú...). Eres una gran compañera y una gran compañía, tenlo claro siempre y sigue siendo como eres porque cualquier trabajo a tu lado es más fácil.

Una de las mejores partes de este tiempo ha sido conocer a mis “niños del labo”... Arturo, recuerda que nos debes algo para 2030. Nunca conocí a nadie tan entusiasta y con las ideas tan claras como tú, ya sabes que te admiro mucho por eso. Espero y estoy segura que te va a ir genial donde estés, aunque echo de menos el tenerte incordiando en mi ordenador, el encontrarme algún post-it de vez en cuando con mensajes para “la Isa del futuro” (creo que ya los encontré todos), o tus tardes intentando hacer rabiar a Maruchi...

¡¡Maruchiiii!! ¡Eres mi polvorilla favorita! Tienes la misma capacidad para sacarme de quicio que para hacerme reír, y sabes que la segunda la has explotado mucho más durante el tiempo que hemos estado juntas. Eres también una gran trabajadora y no me cabe ninguna duda de que le sacas el mejor partido a esa mente

inquieta que va a cien mil por hora. Tienes grandes ideas y una gran motivación, no pierdas nunca esa ilusión y alegría que te hace tan especial. Te auguro un gran futuro tanto como científica como como profesora, ya que he aprendido mucho de ti y tienes una forma de explicar las cosas claras como el agua (ya sabes, para lo bueno y para lo malo...).

The most recent incorporations, Itziar and Eleni: it's being great to know you two, you both have arrived almost in this "writing time", and we are not sharing many moments at the bench, but when we do, joined to the lunch time, the evening breaks or the "extra-academic" meetings, I'm sure that you are going to be also a very good scientist and that you are better people. Thank you both for help me, for make me trust myself, and for making me smile every day. It's great to work with a team like this.

También quiero agradecer a toda la gente que sea más o menos tiempo ha pasado por el labo, siempre he aprendido algo de cada uno y ha sido muy enriquecedor conocerlos a todos aunque no os nombre.

Por supuesto a muchos compañeros de la segunda sur, que aunque muchos ya no estén por aquí han sido una parte principal en mi formación y en hacer el trabajo un poquito más fácil.

A Mary, por ayudarme a encontrar todo a la de ¡ya!, pero principalmente por las charlas, los descansos y las risas con la que me has alegrado muchos días!!

También a todos los técnicos del animalario, que hacen una labor fantástica y permiten que todo vaya rodado, en especial a Ana Ricote, con la que más tiempo hemos compartido este servicio, sobre todo por estar siempre dispuesta a cualquier cosa que necesitara sin perder nunca la sonrisa, y por enseñarme muchas cosas de los animalitos que no aparecen en los libros y que sólo te enseña el ser una profesional como tú.

A todas las unidades técnicas con las que he trabajado, sin ellas no hubiera sido posible nada de esto. Principalmente a celómica y con mención especial a Ligos. Muchas gracias por enseñarme y ayudarme tanto y tanto, a pesar de buscar poblaciones imposibles...

Y en definitiva a todos los que de una manera u otra me habéis enseñado algo, habéis sido muchos y sería prácticamente imposible nombraros a todos.

En el plano más personal me gustaría agradecer a todos mis amigos, los de aquí (salseros y canillejeros), que habéis hecho de mi etapa en Madrid algo maravilloso y de lo que me llevo el haberos conocido, y los de allí, que estáis para todo a pesar de la distancia y gracias a vosotros nunca me llegué a sentir lejos de casa. Tanto unos como otros habéis hecho que estos años sean geniales, y sé que lo vais a seguir haciendo porque da gusto compartir la vida con gente así. Antonio, no me olvidé de ti escribiendo sobre la gente del labo, pero creo que tu figura aquí tiene mucho más sentido. Gran parte de esta tesis te la debo a ti, a tu ayuda y a todo lo que me enseñaste antes de irte, que fue muchísimo. Poco te puedo decir que no te haya dicho antes, sabes que es tan fácil odiarte como quererte, pero a mí aunque lo intentara lo primero no me sale...así que en definitiva, gracias también por todo lo bueno y por todo lo malo que hemos pasado juntos en este tiempo, porque nunca he dejado de aprender de ti.

Por último y más importante, quiero agradecer a mi familia, a mis padres, por toda su ayuda y apoyo incondicional desde que tengo uso de razón. Todo lo que he sido y he hecho desde pequeña os lo debo a vosotros, por haber confiado en mí, por haberme enseñado a trabajar y esforzarme para conseguir lo que me proponga, y por no dejar que caiga en el intento. Gracias por estar siempre ahí. Hermanito, gracias a ti también por las alegrías que me das últimamente, porque hemos tenido nuestros más y nuestros menos pero ahora que hemos crecido estoy muy orgullosa de cómo eres, y estoy segura de que todo será aún mejor, porque igual que yo, tenemos los mejores ejemplos.

Gracias de corazón por todo.

Resumen/Summary

Las células madre hematopoyéticas (HSC), son el origen de todas las células diferenciadas de la sangre de un organismo, y pueden mantener la elevada demanda de reposición de las mismas gracias a su capacidad dual de autorrenovación y diferenciación. Tanto el mantenimiento de su reservorio como su correcta función, se encuentran en gran parte regulados por mecanismos epigenéticos como los ejercidos por el complejo Polycomb. Este complejo es un importante protagonista a la hora de mantener la integridad e identidad celular, mediante el silenciamiento o la activación de distintos genes diana a través de modificaciones de las histonas. Comprende distintas proteínas que clasificamos en dos principales subgrupos: PRC2 y PRC1 que se encargan de iniciar y mantener la represión de la cromatina respectivamente.

En la regulación epigenética de las HSC, se sabe que la enzima Ezh2 presenta un importante papel, mientras que no se había profundizado por el momento en la acción de Ezh1, con quien presenta un alto porcentaje de homología. Este hecho junto a los inversos patrones de expresión que Ezh1 y Ezh2 muestran durante el desarrollo embrionario, nos indican que la actividad catalítica de Ezh1 podría presentar una alternativa a la realizada por Ezh2 en aquellos tejidos y estadios donde ésta última se encuentra presente en menor medida. Por ello hemos realizado un modelo murino en el que eliminamos condicionalmente Ezh1 de la población de células madre hematopoyéticas. Con esta herramienta hemos demostrado que Ezh1 es vital para la correcta funcionalidad de estas células, ya que mediante la represión del locus *Cdkn2a* y otros genes, las protege frente a la entrada en procesos senescentes, permitiendo así que sigan desarrollando sus funciones tanto de diferenciación como de autorrenovación.

Las HSC, residen en la médula ósea de los mamíferos, rodeadas por un grupo heterogéneo de células (nicho o microambiente hematopoyético) que mediante la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, influyen directamente en su supervivencia y correcta función. Sin embargo, se ha estudiado poco acerca de si esta regulación es recíproca y si las células madre hematopoyéticas presentan la misma influencia sobre su nicho. Con este objetivo, hemos investigado esta relación mediante la delección del regulador epigenético Bmi1 en células madres hematopoyéticas y células madres mesenquimales Nestin+, ya que es un conocido regulador epigenético cuyo balance es primordial para las primeras. Nuestros resultados muestran una regulación estrecha y bilateral entre ambas poblaciones celulares, así como la importancia de Bmi1 y su mecanismo represor sobre el locus *Cdkn2a* en ellas.

The hematopoietic stem cells (HSC), are the origin of all the differentiated blood cells of an organism, and they are able to maintain the high-reposition rate of that cells thanks to their double ability of self-renewal and differentiation. Their pool maintenance as well as their correct function, are in a big part regulated by epigenetics mechanisms as those mediated by the Polycomb group genes. This complex is very important at the time of maintain the cellular integrity and identity by the silencing or activation of different target genes with histones modifications. It contains several proteins that we can classify in two main groups: PRC2 and PRC1, and they are on charge of initiate and maintain the repression of the chromatin respectively.

About the epigenetic regulation of HSC, it's known that Ezh2 shows a crucial role, meanwhile there were no deeper studies about the action of Ezh1, who with it shares an elevated homology percentage. This fact, added to the inverses expression patterns that both proteins present during the embryonic development, suggest us that the cathalytic activity presented by Ezh1 can be an alternative to that presented by Ezh2 in those tissues or stages where the last one is less present. Because of that, we have developed a murine model in which we conditionally eliminate Ezh1 in the HSC population. With that tool we have demonstrated that Ezh1 is essential for the correct functionality of those cells, since by the repression of the *Cdkn2a* locus and others genes, Ezh1 protect them against senescent processes, allowing in that way that they can maintain their correct self-renewal and differentiation capacity.

The HSC, reside in the mammals bone marrow, surrounded by an heterogeneous group of cells (HSC niche) that through the secretion of cytokines and growth factors, affects directly their correct function and survival. However, it has been poorly studied if this regulation is reciprocal, and if the HSC present the same influence in their niche. With that goal, we have investigated this relation by the deletion of the epigenetic regulator *Bmi1* in the HSC and MSC-Nes+, since is a well-known regulator and its balance is crucial for the first ones. Our results show a close and bilateral relation between both cellular populations, as the importance of *Bmi1* and its repressor mechanisms over the *Cdkn2a* locus on them.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción	5
1. Epigenética	7
1.1. Complejo Polycomb.....	9
1.1.1. Complejo Polycomb represor 1 (PRC1):	11
1.1.2. Complejo Polycomb represor 2 (PRC2):	13
2. Células Madre Hematopoyéticas	15
2.1. Localización de las HSC (nicho):	18
2.1.1. Tipos celulares	19
3. Regulación epigenética de las células madre hematopoyéticas.....	22
3.1. Regulación de las HSC por el PRC1.....	22
3.2. Regulación de las HSC por el PRC2.....	23
4. Senescencia celular	25
Objetivos	27
Material y métodos	31
1. Mantenimiento y generación de animales	33
2. Procedimientos experimentales con animales in vivo	34
3. Procedimientos experimentales con células MSC ex vivo	37
4. Citometría de flujo	38
5. Técnicas de biología molecular	43
6. Técnicas histológicas	45
7. Análisis estadístico	46
Resultados	47
Capítulo 1: Regulación epigenética de las HSC por la histona metiltransferasa Ezh1 ..	49
1. Expresión endógena de la histona metiltransferasa Ezh1 en HSC jóvenes y envejecidas.....	49
2. Generación de un alelo murino con delección condicional para-Ezh1	50
3. Evaluación de los efectos en médula ósea de la ausencia de Ezh1 en HSC	52
4. Análisis de la capacidad de repoblación de médula de las HSC deficientes en Ezh1	54
5. Caracterización de las HSC Ezh1-KO	57
6. Evaluación de senescencia en las HSC de los animales Ezh1-KO	59
7. Regulación génica por Ezh1	62

8. Reversión del fenotipo senescente de las HSC Ezh1-KO por represión del locus Cdkn2a.....	66
9. Caracterización fenotípica del modelo murino Ezh1-KO en órganos hematopoyéticos maduros	68
Capítulo 2: Regulación de las células madre hematopoyéticas y su nicho mediante el gen Bmi1	71
1. Principales fuentes de Bmi1 en la médula ósea	71
2. Papel regulador de Bmi1 en los subtipos celulares del nicho hematopoyético... 72	
2.1. Consecuencias en el nicho hematopoyético cuando la ausencia de Bmi1 produce una disminución de las HSC.....	74
2.2. Caracterización del nicho hematopoyético tras la eliminación del gen regulador Bmi1 en las MSC.....	77
3. Evaluación de la represión de Cdkn2a por Bmi1 y sus efectos sobre el nicho hematopoyético	81
Discusión	83
Capítulo 1: Regulación epigenética de las HSC por la histona metiltransferasa Ezh1	85
Capítulo 2: Regulación de las células madre hematopoyéticas y su nicho mediante el gen Bmi1	91
Conclusiones	95
Bibliografía	99
Anexos	113
Anexo I: Artículos que forman parte de la tesis	115
- Ezh1 is required for Hematopoietic Stem Cell Cycle Arrest.....	117
- New epigenetic pathway for stemness maintenance mediated by the histone methyltransferase Ezh1	131
Anexo II: Otros artículos publicados	133
- Insight Into Stem Cell Aging	135
- Bmi1 limits dilated cardiomyopathy and heart failure by inhibiting cardiac senescence	149

Abreviaturas

Bmi1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bobino
C12FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside
CAR	Retículo abundante en CXCL12
CFSE	5(6)-Carboxyfluoresceína diacetato N-succinimidil ester
CFU	Unidades formadoras de colonias
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CLP	Progenitores linfoides comunes
CMP	Progenitores mieloides comunes
EC	Células endoteliales
ESC	Células madre embrionarias
Ezh1	<i>Enhancer of zeste 1</i>
Ezh2	<i>Enhancer of zeste 2</i>
FBS	Suero bovino fetal
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP	Progenitores mieloides de granulocitos
GRA	Granulocitos
GVHD	Enfermedad de injerto contra anfitrión
H&E	Hematoxilina y eosina
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona deacetilasa
HDM	Histona demetilasa
HMT	Histona metiltransferasa
HSC	Células madre hematopoyéticas
KFP	Proteína fluorescente Katushka
LYM	Linfocitos
MEP	Progenitores mieloides de eritrocitos
MPP	Progenitores multipotentes
MSC	Células madre mesenquimales
OBC	Osteoblastos
ORO	<i>Oil Red O</i>
PBS	Tampón fosfato alcalino

PcG	Grupo Polycomb
PLT	Plaquetas
PRC1	Complejo represor Polycomb 1
PRC2	Complejo represor Polycomb 2
RBC	Células rojas de la sangre
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SPF	Zona libre de patógenos
TrxG	Grupo Tritorax
WBC	Células blancas de la sangre
WT	<i>Wild type</i> , genotipo silvestre

Introducción

1. Epigenética

El término ‘epigenética’ fue acuñado por C.H. Waddington en la década de los 40 para referirse al estudio de las interacciones entre genes y factores ambientales que se producen en los organismos. Actualmente, definimos la epigenética como la rama de la biología que pretende explicar por qué los organismos vivos expresan unos genes y silencian otros, estableciendo así tanto sus características físicas particulares como la susceptibilidad de desarrollar determinadas enfermedades. Este fenómeno también aclara como las células de un mismo organismo con idéntica carga genética son capaces de originar formas completamente distintas, como una neurona o un linfocito.

Estas modificaciones se establecen como cambios en la expresión génica que no pueden ser atribuidos a modificaciones en la secuencia del ADN, sino que se deben a mecanismos moleculares implicados principalmente en la transformación de la cromatina abierta o eucromatina en cromatina cerrada o heterocromatina, conformaciones que van a determinar el destino de la célula en cuestión, estableciendo una decisión sobre qué genes van a expresarse.

Los mecanismos moleculares epigenéticos comprenden principalmente la metilación del ADN o las modificaciones de histonas (Sashida et al., 2012). Más recientemente se han incorporado ciertas acciones ejercidas por ARNs no codificantes (Peschansky et al., 2014).

El estudio central de esta tesis, se basa principalmente en el contexto de la remodelación de la cromatina mediante las modificaciones de histonas, entre las que encontramos acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones o ubiquitinaciones de las mismas en su extremo N-terminal, siendo las dos primeras las más importantes.

Las acetilaciones presentan como responsables enzimáticas a las familias HATs (histona acetil-transferasa) que catalizan la transferencia de grupos acetilos procedentes del acetil-CoA hasta los residuos de lisina de las histonas, promoviendo que se forme la estructura abierta de la cromatina y la consecuente activación de la expresión génica. Los grupos acetilo son retirados por las HDACs (histona-deacetilasa), que junto a las HAT forman complejos multiproteicos con factores de transcripción y receptores nucleares, dirigiendo así el destino transcripcional de la secuencia de ADN (Berger et al., 2007).

Por otro lado, las enzimas HMT (histona metil-transferasas) son responsables de las metilaciones de las histonas, y al contrario que las anteriores se asocian a la compactación de la cromatina favoreciendo de esta manera el silenciamiento del gen

diana, aunque hay excepciones como el caso de la H3K4me3, marca conocida por promover la activación de la cromatina. Al igual que en el caso de las HDACs, existe la familia HDM (histone-demetiltransferasa), que retiran estos grupos metilos (Cullen et al., 2014) activando de nuevo la cromatina.

Entre los principales responsables y reguladores de estas modificaciones se encuentran los complejos *Polycomb* (PcG) y *Trithorax* (TrxG), que ejercen funciones represoras y activadoras respectivamente sobre la expresión génica mediante modificación de las histonas (Steffen et al., 2014).

En primer lugar, las proteínas del grupo *Polycomb* (represor) fueron descritas inicialmente en *Drosophila melanogaster* como importante contribuyente a la correcta segmentación corporal por la modificación de genes “*homeobox*” (Lewis, 1978). Actúan modulando la cromatina hacia su forma menos accesible, por lo que silencian los genes evitando el reconocimiento del ADN diana por parte de la maquinaria transcripcional. Como veremos en detalle, en mamíferos se han descrito proteínas homólogas que actúan fisiológicamente en la regulación del ciclo celular, y su desregulación en humanos está implicada en importantes patologías como cáncer de mama o próstata (Jovanovic et al., 2010; Berezovska et al., 2006).

Por su parte, el grupo proteico *Trithorax* también descrito en *Drosophila* y con su correspondiente homólogo en mamíferos, regula positivamente la expresión génica haciendo que la cromatina sea más accesible a la transcripción. Las funciones de este complejo están asociadas a la generación de algunos tumores y la auto-renovación de las ESC, así como a la determinación de su destino celular y proliferación (Schuettengruber et al., 2011). Es un grupo de genes muy heterogéneo, entre los que existe un subcomplejo con dominio SET catalítico que ejerce actividad metiltransferasa, un conjunto de reguladores de la cromatina ATP-dependiente, y otro grupo modificador de histonas que puede unirse directamente al ADN. El primer grupo es el encargado de la trimetilación de la H3 en la lisina 4, siendo esta una marca común de activación de la cromatina. Este grupo actúa en perfecta coordinación con el complejo *Polycomb*, que como veremos en el siguiente apartado, cataliza entre otras reacciones la trimetilación de la H3K27 ejerciendo una represión de la transcripción. Ante la ausencia de esta marca, se favorece la unión de MLL1 (componente de *trithorax*) en mamíferos a la región promotora del gen, induciendo este la actuación de la metiltransferasa SET1 que generará la H3K4me3 (Schuettengruber et al., 2007), involucrada en el mantenimiento

de la conformación abierta de la cromatina y por tanto activadora de la maquinaria transcripcional.

1.1. Complejo *Polycomb*

Esta tesis se centra en el estudio del complejo *Polycomb*, un grupo de proteínas imprescindibles en el mantenimiento de la identidad celular y que ha sido ampliamente conservado en la evolución entre especies (Lanzuolo et al., 2012). En mamíferos, este complejo está formado por varios genes que se clasifican según su función, en los llamados complejo represor *Polycomb* 1, o de mantenimiento (PRC1) y complejo represor *Polycomb* 2, o de iniciación (PRC2).

	<i>Drosophila</i>	Mamíferos	Función principal
PRC1	Pc	Cbx 2, 4, 6 y 8	Proteína de unión a H3K27m3 y H3K9me3.
	PSC	PCGF 1, 2 (Bmi1), 3, 4 (Mel18), 5 y 6	Ubiquitinación H2AK119, compactación de la cromatina, desmetilación de H3K4 y H3K36.
	Sce	RING1A y RING1B	Ubiquitinación H2AK119, compactación de la cromatina y bloqueo de RNA Pol II.
	dRYBP	RYBP y YAF2	Reclutamiento del PRC1.
PRC2	E(z)	Ezh1 y Ezh2	Mono, di y trimetilación de H3K27 y compactación de la cromatina.
	Su(z)12	SUZ12	Acoplamiento del PRC2, unión a RNA.
	ESC	EED, JARID2, RbAp46/48	Reconocimiento de H3K27me3, unión al RNA, desmetilación de histonas, reclutamiento de PRC2

Tabla 1: Resumen de los componentes más importantes del grupo *Polycomb* en *Drosophila Meganolaster*, sus equivalentes en mamíferos y sus funciones principales.

La ruta canónica de actuación de este complejo para la represión de la cromatina en sus genes diana comienza con la acción del PRC2 (Margueron et al., 2011), que inicia la represión génica metilando la lisina 27 de la histona H3 en las regiones promotoras de los genes afectados. Esta actividad HMT, se lleva a cabo mediante las unidades catalíticas Ezh1 o Ezh2, junto a las proteínas auxiliares EED y SUZ12. Esta señal es reconocida por los genes de la familia CBX o por la proteína RYBP (Gao et al., 2012) pertenecientes al PRC1, lo que da lugar a la ubiquitinación de la H2A en la lisina 119 mediante la actividad enzimática de RING1A o RING1B, que unidas a alguno de los PCGF como Bmi1, añaden una molécula de gran tamaño que dificulta físicamente la presencia de la ARN Polimerasa II (Steffen et al., 2014), interrumpiendo así el proceso de transcripción y silenciando el gen en cuestión.

A pesar de ser esta por el momento la ruta más aceptada en la literatura, se ha visto que el PRC1 es capaz de ubiquitinar la histona H2A independientemente de la

presencia de trimetilación en la histona H3, como en el caso de la inactivación del cromosoma X (Schoeftner et al., 2006), al igual que se ha comprobado que la subunidad RING1B es capaz de compactar la cromatina sin necesidad de ubiquitinación (Eskeland et al., 2010).

No obstante, hallazgos más recientes, describen una alternativa inversa a este modelo jerárquico de compactación de la cromatina, en el cuál, las variantes no canónicas del PRC1 (aquellas que contienen a PCGF1, 3 o 5) pueden ubiquitinar las histonas sin necesidad de metilación previa, reclutando de esta forma al PRC2 (Blackledge et al., 2014). A su vez, se propone que el complejo canónico del PRC1 (aquel en el que RING1A/B se unen a Bmi1 o Mel18), es reclutado tras este proceso por el PRC2 cómo ya se había descrito (Schwartz et al., 2014).

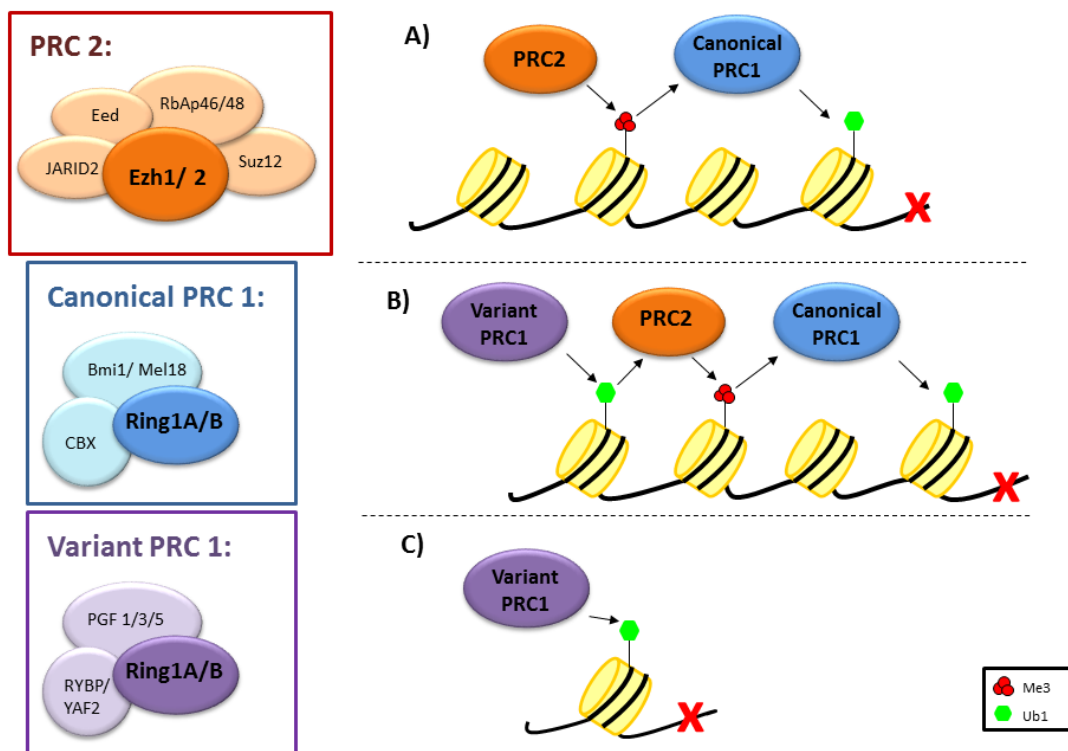


Figura 1: Representación esquemática de los principales componentes de los complejos represores *Polycomb* y sus posibles mecanismos de acción descritos sobre las histonas:

- A) Ruta canónica de *Polycomb*, en la que PRC1 ubiquitina a la H2AK119 tras la trimetilación de la H3K27 por el PRC2.
- B) Misma ruta en la cual el PRC2 es reclutado tras la ubiquitinación realizada por el complejo alternativo PRC1.
- C) El complejo alternativo PRC1 es capaz de reprimir la cromatina mediante la ubiquitinación de la H2AK119 sin necesidad de metilación.

1.1.1. Complejo *Polycomb* represor 1 (PRC1)

Entre las proteínas que conforman esta parte de *Polycomb*, en primer lugar nos encontramos con la familia CBX, que presentan afinidad por los residuos de H3 di o trimetilados en la lisina 27, reclutando con ello al resto del PRC1 tras la metilación por parte del PRC2. Hay al menos ocho miembros de esta familia CBX en humano y ratón, y están involucrados en los procesos de regulación de la heterocromatina, expresión génica y programas de desarrollo, así como de la decisión entre pluripotencia o diferenciación a ciertos linajes (Ma et al., 2014).

También en el PRC1 se encuentran las proteínas Ring1A y Ring1B, responsables de la ubiquitinización de la lisina 119 en la H2 (H2K119), marca generada con el objeto de evitar el acceso a la maquinaria transcripcional, compuesta por la ARN Polimerasa II y los factores de transcripción, consiguiendo en última instancia el silenciamiento del gen afectado (Vidal, 2009).

La incorporación más reciente al complejo PRC1 son las proteínas RYBP y su homólogo YAF2. Las dos se pueden unir a RING1A o RING1B mediando el reclutamiento del PRC1 hacia la cromatina, sugiriendo así un patrón de actuación alternativo al mediado por CBX (Gao, Zhang et al. 2012).

La presencia de varios parálogos en los componentes del PRC1, sugiere la existencia de solapamiento y funciones redundantes. Este hecho se ve corroborado debido a que los ratones carentes de cualquier proteína del PRC1 no mueren durante el desarrollo, exceptuando el caso de Ring1B (Voncken et al., 2003).

Por otro lado se encuentran los llamados PcGFs (*Polycomb Ring Fingers*), un subconjunto de 6 proteínas homólogas entre las que se encuentran Mel18 o Bmi1, principal componente de este complejo que nos ocupa durante la tesis. Estos PcGFs fueron identificados como formadores de diferentes complejos PRC1 y caracterizados como componentes adicionales con distintas actividades enzimáticas, desde actividad HMT para la lisina 9 de la H3, hasta actividad HDM para las lisinas 4 y 36 de la misma (Gao, Zhang et al. 2012).

- **Bmi1:**

La proteína Bmi1 fue descrita en mamíferos como un oncogén necesario para la formación de linfomas junto a *c-myc* que se ha conservado ampliamente entre especies durante la evolución desde *Drosophila* (Van Louhizen et al., 1991; Haupt et al., 1993). Se encuentra presente de forma ubicua en casi todos los tejidos, y los niveles de expresión más altos se han detectado en cerebro, esófago, glándulas salivales, timo, riñón, pulmón, gónadas, placenta, sangre y médula ósea (Huber et al., 2012).

El gen Bmi1 está compuesto por 10 exones y genera una proteína de 326 aminoácidos compuesta por un dominio amino terminal *RING finger* y un dominio central *helix-turn-helix* (van Lohuizen et al., 1991). Estas regiones son de vital importancia para la unión de Bmi1 a otros componentes del grupo PRC1, como a RING1B, activando así la actividad E3 ubiquitin ligasa (Li et al., 2006).

La proteína Bmi1 es un regulador clave para el mantenimiento del estado represivo de muchos genes mediado por la acción del PRC1 en cuanto a la remodelación de la cromatina y modificación de las histonas (Simon and Kingston 2009) y es la responsable de reclutar a los demás reguladores epigenéticos hasta locus específicos (Bracken AP et al., 2007).

Bmi1 presenta una importante contribución a los procesos de mantenimiento y auto-renovación de las células madre adultas, la cual se describió principalmente en HSC, cuando ratones deficientes en Bmi1, mostraron importantes deficiencias en cuanto al número total de estas, así como a su capacidad de autorrenovación (Park et al., 2003, Arranz et al., 2012). Las células madre neuronales, es otra de las principales poblaciones en las que Bmi1 se ha establecido como factor necesario para su mantenimiento (Molofsky et al., 2003).

A estos sistemas, más recientemente se les han ido añadiendo otros en los que la correcta regulación de este gen es crucial para la preservación del reservorio de células madre y por tanto la correcta homeostasis del organismo. Encontramos entre ellos las células madre intestinales (Sangiorgi and Capecchi, 2008), las células acinares del páncreas (Sangiorgi and Capecchi, 2009) o las células madre prostáticas (Lukacs et al., 2010). En todos estos sistemas, Bmi1 juega un importante papel en los mecanismos de ciclo celular, controlando a este y protegiendo al tejido frente a los procesos de senescencia celular (Siddique and Saleem, 2012). Estos procesos en los que se encuentra implicado Bmi1, se deben principalmente a su papel represor del locus Cdkn2a, que codifica a las proteínas p16^{INK4a} y p19^{ARF} y son genes supresores

tumorales. Bmi1 se une directamente al gen p16INK4a mediante un BRE (Bmi-1 response element) situado en el promotor del mismo para que así al resto del PRC1 pueda ejercer su acción represora (Meng et al., 2010).

Además, en diversos tipos de cáncer, se han descrito mecanismos en los que Bmi1 actúa como un oncogén independientemente de su regulación sobre p16^{INK4a} y p19^{ARF}, como en gliomas, carcinomas hepáticos o sarcoma de Ewing (Bruggeman et al., 2007; Xu et al., 2009; Douglas et al., 2008). En HSC se demostró que una de sus vías de actuación es la interacción con E4F1, una atípica E3 ubiquitin-ligasa que actúa sobre p53 promoviendo el ciclo celular (Le Cam et al., 2006). Su expresión es esencial en el sistema hematopoyético y su inactivación conduce a apoptosis y consecuentes defectos medulares (Grote et al., 2015), puesto que el fenotipo de células Bmi1^{-/-} era rescatado mediante la eliminación de este gen en ellas y sin verse afectados los niveles de INK4a/ARF (Chagraoui et al., 2006).

1.1.2. Complejo *Polycomb* represor 2 (PRC2)

En este segundo grupo del complejo *Polycomb*, encontramos tres subunidades principales: Suz12 y Eed, imprescindibles para la formación del PRC2 y las histonmetiltransferasas Ezh1 y Ezh2, que son las responsables de la actividad catalítica para esta función. Adicionalmente, existen proteínas complementarias que colaboran con el complejo como JARID2 o RbAp46/48 (Vizán et al., 2015).

El PRC2, es el responsable de trimetilizar la lisina 27 de la histona 3, para así como parte del mecanismo canónico de *Polycomb*, reclutar al PRC1 mediante unión de este residuo metilado a CBX, iniciando así la represión de la cromatina (Margueron and Reingberg 2011).

Tanto Ezh1 como Ezh2, provienen de la duplicación en *Drosophila* de su homólogo, *Enhancer of zeste* (E(z)), lo cual podría indicar que tienen un papel intercambiable, pero como veremos más adelante no sucede así, sino que aparentemente, durante la evolución se ha producido una división de la funcionalidad de E(z), y ambas muestran preferencias distintas en cuanto a la metilación de las H3K27 (Margueron et al., 2008). El papel de Ezh2 ha sido ampliamente estudiado y establecido como un oncogén, debido a su elevada expresión en numerosos tipos de cáncer, como próstata, mama o algunos linfomas, correspondiéndose además los mayores grados de expresión con los peores pronósticos o los estadios más avanzados de la enfermedad (Simon et al., 2008). Esta histonmetiltransferasa se encuentra altamente expresada en las

células con alto potencial de proliferación y diferenciación, como son las ESCs. Su patrón de expresión sigue un incremento durante el desarrollo embrionario y se reduce drásticamente tras el nacimiento (Margueron et al., 2008).

- Ezh1:

Esta proteína fue descrita en mamíferos en 1996 (Abel KJ. et al, 1996), mientras que su homóloga Ezh2 ha sido bien caracterizada hasta el momento, la literatura sobre Ezh1 aún se muestra escasa, si bien, podemos decir que el número actual de publicaciones es tres veces superior al momento en que se empezó este trabajo.

Ezh1, presenta 21 exones y codifica una proteína en humano de 747 aminoácidos. Su dominio SET catalítico se sitúa en el extremo carboxi-terminal y es prácticamente idéntico al presentado por Ezh2 (86% de homología) (Abel KJ. et al, 1996). Este dominio que presentan ambas proteínas, es una secuencia de aproximadamente 150 aa que ha sido altamente conservado durante la evolución desde *Drosophila* y es el responsable en ambas de la actividad metil-transferasa de grupos metilo a estados activos o no de la cromatina (Quian C et al., 2006). Dicha actividad se estableció en estudios realizados con ESC *knock out* para Ezh2. En ellas se encontró una reducción global de las marcas epigenéticas H3K27me2 y H3K27me3, pero esta metilación no se vio abolida por completo, además de que se mantenía una presencia robusta de la marca H3K27me, atribuyéndose esta función al PRC2 formado por Ezh1, ya que esta proteína al igual que su homóloga no actúa fuera del complejo, sino que requiere la presencia de EED y Suz12 para desarrollar su actividad enzimática (Shen et al, 2008).

En cuanto a su expresión, sus niveles en ciertos tejidos son mayores que los de Ezh2, como cerebro, riñón, próstata o bazo. Existen otros en los que se encuentra exclusivamente Ezh1, como tejido adiposo, paratiroides o glándula pituitaria. También se ha visto que en algunos tipos humanos de cáncer, su expresión es tan alta como la de su proteína homóloga, con lo cual podría ser también un indicador de pronóstico para los casos de riñón, próstata y piel (Shen et al, 2008)

Por regla general, Ezh2 se encuentra presente en tejidos más proliferativos actuando sobre la transmisión de la marca represiva durante la replicación, mientras que Ezh1 se encuentra en células madre adultas directamente involucrada en la represión de dicha proliferación (Margueron et al, 2008). Por ejemplo, en estudios realizados con líneas celulares humanas, se vio que Ezh1 era necesario para activar la diferenciación miogénica, mientras que Ezh2 se requería para la correcta proliferación de los

mioblastos (Stojic et al., 2011). Lo mismo ocurre en células del cortex humano, donde la expresión de Ezh1 es mucho mayor que en sus progenitores neuronales (Weng et al., 2012).

Existen otros trabajos, basados en células de la piel, en los que se ve que la delección de uno u otro no tiene consecuencias en la integridad de la misma. Sin embargo, la abolición de ambas enzimas, impide severamente la correcta formación y mantenimiento del folículo piloso. En este caso Ezh1 y Ezh2 sí presentarían actividad redundante (Ezhkova et al., 2011).

Tras este trabajo, centrado en las células madre hematopoyéticas, son varias las implicaciones que se han descrito de Ezh1 en diversas patologías, por ejemplo, ambas metilhistontransferasas han demostrado participar la diferenciación de las células Merkel en células madre de la piel mediante la represión del factor de transcripción Sox2, teniendo un papel crucial en el desarrollo de patologías como el carcinoma de células Merkel intraepiteliales (Bardot et al, 2013). Existen otros casos, como el glioblastoma multiforme, un tumor primario incurable del linaje astrocítico, en el que la enzima Ezh1 se encuentra regulada negativamente, al contrario que su homólogo Ezh2. Estos hechos se ven pronunciados con el progreso de la enfermedad y correlacionan con una baja supervivencia (Li et al, 2013).

También se ha visto una importante función de Ezh1 en cuanto a la función inmune, ya que su actividad endógena en macrófagos y células dendríticas, ejerce una represión del factor *Tollip*, inhibidor de la ruta mediada por TLR en la que se producen distintas citoquinas inflamatorias. Este papel de Ezh1 se considera necesario para esta alteración pero no suficiente, ya que su sobreexpresión por sí sola no genera el mismo efecto (Liu et al, 2015).

2. Células Madre Hematopoyéticas.

Se define hematopoyesis como el proceso de formación, desarrollo y maduración de todas las células de la sangre, fenómeno que en mamíferos tiene lugar principalmente en la médula ósea, a partir de las llamadas células madre hematopoyéticas (HSC).

Descubiertas por Till y McCulloch en la década de los 60 (Siminovich et al, 1964), las HSC han sido con diferencia las células madre más estudiadas hasta la fecha, así como las más empleadas en ensayos clínicos (Daley, 2012).

Aunque indudablemente el trasplante de HSC, realizado por primera vez en los años 50 (Thomas, 2005), es la aplicación con células madre más extendida en medicina hasta la fecha, la tasa de éxito es relativamente baja, presentándose una alta morbilidad y mortalidad en los pacientes trasplantados debido a la llamada GVHD (enfermedad de injerto contra anfitrión). Esta enfermedad produce una respuesta inmune por parte de las células del donante contra los tejidos del receptor (Daley, 2012), con lo que aún es necesaria una precisa descripción de los mecanismos de unión molecular entre ambas células para mejorar el éxito de este tratamiento.

Durante el desarrollo murino embrionario, las primeras HSC aparecen en el saco vitelino en el estadio 7'5. Tras ello migran al embrión y se pueden localizar sucesivamente en la AGM (E9), hígado fetal (E10) y placenta (E10'5-11). Posteriormente se forman los órganos hematopoyéticos maduros como timo y bazo y se sitúan en ellos hasta el estadio 16, cuando pasan a médula ósea y allí se mantiene la hematopoyesis hasta el sistema adulto (Mazo et al, 2011).

Ya en médula adulta, la organización del sistema hematopoyético en mamíferos se presenta en un sistema jerárquico piramidal en cuyo vértice se encuentran las HSC, que se definen principalmente por dos características:

a) *Multipotencia*: Son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares de un órgano o tejido, en este caso la sangre, que en humano adulto tiene una tasa de renovación de más de un millón de células maduras por segundo (Seita and Weissmann 2010).

b) *Capacidad de autorenovación*: Es una división celular especializada en la que una o ambas de las células hijas permanecen no diferenciadas, y mantienen exactamente el mismo potencial de replicación que la célula madre. Este proceso es necesario para el mantenimiento de la homeostasis, haciendo que el reservorio de células madre hematopoyéticas quiescentes se mantenga constante durante la vida del organismo (Akala and Clarke 2006).

En la base de esta jerarquía encontramos a las llamadas LT-HSC, que constituyen el reservorio de auténticas células madre hematopoyéticas. Estas células permanecen en un estado relativo de quiescencia, el cual protege su integridad genómica reduciendo el número de divisiones celulares y por tanto la posibilidad de adquirir daño genómico que pueda comprometer la diferenciación multilineal así como originar desórdenes malignos con el tiempo (Orkin and Zon, 2008). Todas las HSC se caracterizan citométricamente por ser linaje negativas (Lin-), y mostrar su doble

expresión en los marcadores c-KIT y Sca-1 (LSK). En el caso de las LT-HSC murinas, hay que añadir que no expresan marcadores CD34 (al contrario que en humanos) ni CD135. Estas células también se pueden determinar por la expresión de los marcadores LSK y el patrón de los marcadores SLAM: CD48-CD150+ (Kiel et al,2005). Este subconjunto de HSC es el que presenta mayor capacidad de auto-renovación con el objetivo de mantener este reservorio, mientras que su capacidad de diferenciación es limitada, dando lugar al siguiente tipo celular: ST-HSC. Las ST-HSC presentan un balance más igualitario entre diferenciación y auto-renovación, y se caracterizan por ser Lin-, cKIT+, Sca1-, CD34lo y CD135-. Estas células son encargadas de regenerar los linajes sanguíneos más a corto plazo mediante su diferenciación a MPP (progenitores multipotentes). Este último grupo de las HSC, se caracteriza por presentar una mayor capacidad de diferenciación, dado que precede a los progenitores linfoides y mieloides (CLP y CMP) que finalmente van a dar lugar a las células maduras de la sangre, mientras que su autorrenovación es prácticamente inexistente. Al igual que sus predecesoras, son Lin-, Sca1+ y cKIT+, y muestran una baja expresión tanto de CD34 como de CD135 (CD34lo, CD135lo) (Rieger et al,2012).

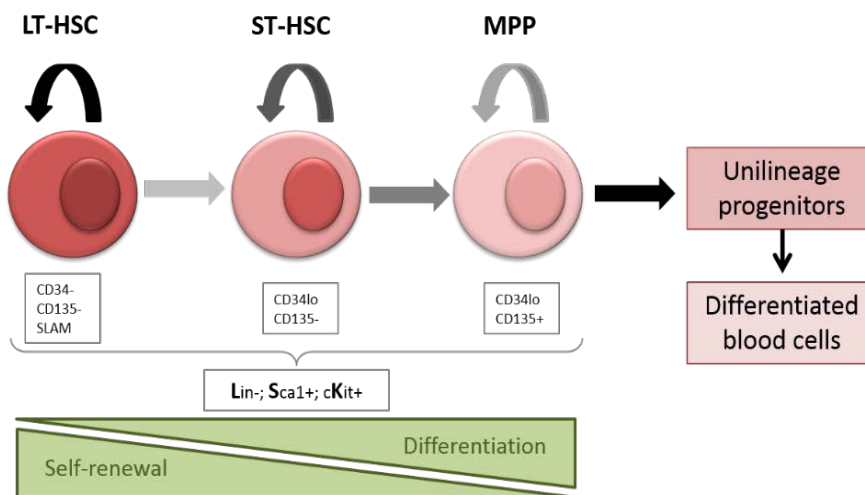


Figura 2: Clasificación de las células madre hematopoyéticas murinas, en función de su capacidad de autorrenovación vs diferenciación y marcadores citométricos que las identifican.

2.1.Localización de las HSC (nicho):

A raíz de los descubrimientos de Till y McCourt y debido a que se basaban en CFU formadas con HSC provenientes del bazo, se empezó a postular la teoría de que las HSC necesitaban un nicho hematopoyético para mantener sus habilidades de pluripotencialidad y autorenovación. Esta teoría permitió que se mantuvieran los primeros cultivos ex vivo de HSC gracias a un tejido estromático mesenquimal por el hematólogo Michael Dexter. Posteriormente, su colega Brian Lord, observó que las HSC en la cavidad medular, tendían a localizarse en el margen endosteal, manteniendo la hipótesis de que el hueso quizá regule la hematopoyesis. Tras estos estudios se comprobó que el co-cultivo de HSC y osteoblastos diferenciados, podría ser beneficioso para las primeras por la producción de citoquinas favorables por parte de los últimos (Morrison and Scadden, 2014). Estos hallazgos hicieron posible la traslación más actual a modelos transgénicos murinos, con los que se mostraron las primeras evidencias in vivo de la regulación por parte de los osteoblastos. Aunque hoy en día se cree que dicha regulación es indirecta (Calvi et al, 2003; Zhang et al, 2003), en esos estudios se comprobó que la presencia de osteoblastos maduros es crucial para la hematopoyesis.

Al trasplantar HSC en ratones irradiados también se observó que tendían más a colocarse en la zona endosteal (preferiblemente alrededor de los vasos sanguíneos), (Ellis et al, 2011) que en la perivascular. Sin embargo, sabemos que la irradiación empleada afecta a las células endoteliales sinusoidales, existiendo la posibilidad de que los únicos vasos íntegros sean los más cercanos al hueso. Esto también explicaría la predilección de las HSC por dicha zona (Hooper et al, 2007).

Hoy sabemos que las HSC no se encuentran distribuidas aleatoriamente en la médula ósea, sino que residen cercanas al entramado estromal y neuronal y rodeando a los pequeños vasos sinusoidales, considerándose esta última zona como nicho perivascular. Mediante estudios de imagen in vivo, se ha demostrado que su localización en este nicho, podría estar definida en función del grado de quiescencia, situándose las células más proliferativas y diferenciadas alrededor de los vasos sanguíneos, mientras que las más quiescentes estarían en la zona más cercana al hueso (Lo Celso et al, 2009).

2.1.1. Tipos celulares

En la actualidad son muchos los estudios realizados con el objetivo de definir el tipo de células que comprenden el nicho hematopoyético y elucidar su contribución a la función y mantenimiento de las HSC.

Por el momento, los tipos celulares comprendidos en el nicho hematopoyético, es un grupo amplio y heterogéneo. Los primeros incluidos fueron los osteoblastos y las células CAR (*Cxcl12 abundant reticular*). Posteriormente, se definieron las células madre mesenquimales (MSC) como aquellas células no hematopoyéticas que en cultivo son adherentes y pueden formar CFU-F, además de su potencial para diferenciarse a progenies osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas. Entre estas células encontramos principalmente las MSC-Nestin⁺ (Mendez-Ferrer et al, 2010), y más tarde se describieron las MSC-LepR⁺ (Zhao et al, 2014). Aún existe controversia en cuanto a la definición de unos marcadores citométricos para este tipo celular, siendo por el momento los más aceptados PDGFR α y CD51 (Pinho et al, 2013).

Adicionalmente, también se incluyen como parte del nicho las células endoteliales y perivasculares, así como otras poblaciones como las células Schwan⁺ o adipocitos (Morrisson and Scadden, 2014).

- **Osteoblastos:** A pesar de ser el primer subgrupo de células descritas como parte del nicho hematopoyético, más tarde se vio que su regulación sobre las HSC podría ser indirecta (Calvi et al, 2003 – Zhang et al, 2003). En primer lugar, varios estudios de imagen in vivo demostraron la proximidad física entre HSC y osteoblastos. Por ello se realizaron varios estudios en los que se reducía su población por distintos mecanismos, mostrando un notable descenso en los precursores de linfocitos B, tras lo cual se produjo la disminución de las HSC. Por último, mediante modelos modificados genéticamente desde los precursores de osteoblastos, se observó que las HSC se veían afectadas tanto en su capacidad de proliferación como de diferenciación. Sin embargo, esta alteración no se detectaba cuando las mismas modificaciones eran aplicadas a osteoblastos maduros. Estos y otros trabajos indican que la afectación a las HSC se daría más bien por las células mesenquimales precursoras de osteoblastos que por aquellos que hayan completado su ciclo de maduración. No obstante, el hecho de que puedan secretar factores de crecimiento y citoquinas, haría de estas células unas reguladoras indirectas del nicho hematopoyético.

- **Células CAR:** La quimioquina CXCL12 (también conocida como Sdf-1), presenta como principal receptor fisiológico a CXCR4. Ha sido bien caracterizada como factor de crecimiento para los precursores de células B. Numerosos estudios han demostrado que la señalización CXCL12-CXCR4 es esencial para la repoblación y el mantenimiento de las HSC quiescentes, así como para el desarrollo de ciertas células con función inmune. La importancia de esta quimioquina se demostró cuando la delección inducida del receptor CXCR4 en ratones adultos, resultaba en una severa reducción del número de HSC. La mayoría de estas células se mostraron en contacto con aquellas que expresaban grandes cantidades de CXCL12 (CAR), que se encuentran principalmente rodeando a las células endoteliales que forman los vasos sinusoidales, y parecen ser una parte fundamental del nicho de las células madre hematopoyéticas (Sugiyama et al, 2006).

- **MSC-Nestin+:** La nestina es una proteína de filamento intermedio que fue originalmente identificada como marcador de los progenitores neuronales. Se ha detectado su expresión en un amplio rango de células progenitoras y endoteliales.

Mediante el uso de modelos transgénicos NesGFP+, se observó que su disposición en médula ósea era exclusivamente perivascular, y que aproximadamente un 60% de las HSC se mostraban adyacentes a este tipo celular. Estas células empezaron a considerarse MSC debido a que una vez sorteadas, presentaban la habilidad para diferenciarse en adipocitos y osteoblastos, así como capacidad de formar CFU-F. Sin embargo, no todas las células Nes-GFP+ tendrían esas características, si no que las presentarían entre un 0,7 y 6,9% de las células obtenidas. Este hecho aumentaba la posibilidad de que muchas células que expresaban Nestin no fuesen realmente células madre mesenquimales (Mendez-Ferrer et al, 2010). En el mismo trabajo, por eliminación de dichas células, se estableció que forman parte de un entramado fundamental para el mantenimiento y funcionalidad de las HSC. Esto podría deberse a la proximidad física de los dos subgrupos celulares.

- **MSC Lepr+:** Estas células positivas para el receptor de Leptina, fueron recientemente identificadas como la mayor fuente de Scf y Cxcl12 en la médula ósea. La delección condicional del factor Scf en estas células, afectaba severamente a la fracción quiescente de las HSC (Ding L et al., 2012), mientras que la delección de Cxcl12 afectaba a la movilización de las mismas (Ding and Morrison, 2013). Esta fracción celular también demostró su capacidad para formar CFU-F y que eran positivas para los marcadores de MSC PDGFR α y CD51 (Zhou et al, 2014).

- **Células endoteliales:** Las arterias entran en la médula ósea por el hueso cortical y continúan en los típicos capilares que confluyen en un complejo sistema de vasos sinusoides, ramificándose en la cavidad medular. Algunos de ellos presentan fenestraciones que dejan un lumen abierto por el que se permite un lento flujo sanguíneo de las células generadas en la médula ósea (Sugiyama et al, 2012).

En secciones de médula analizadas mediante los marcadores “SLAM”, las HSC se han asociado con el endotelio sinusoidal, sugiriendo por tanto que las células endoteliales también presentan una función en el nicho de las células madre hematopoyéticas (Kiel et al, 2005). En otros trabajos, tras mieloablación, se comprobó que la activación de *Akt1* en células endoteliales de ratón adulto, incrementaba el número de HSC y aceleraba el proceso de recuperación (Kobayashi et al, 2010). Esta importante influencia sobre las HSC, se podría deber a la secreción del factor de crecimiento *Scf* por parte de las células tanto endoteliales como perivasculares, ya que se demostró que la delección directa de esta citoquina, no afectaba a la viabilidad de las HSC cuando era eliminada de otras fracciones celulares del nicho, como osteoblastos o células Nestin+ (Ding et al, 2012).

- **Otras células:** Existen otros tipos celulares que también se han establecido como parte del nicho hematopoyético. Entre ellas destacan las células Schwann+, células gliales que por su cercanía a una gran proporción de HSC y por su actividad en cuanto al control del factor TGF β , presentan una importante influencia en el mantenimiento de estas HSC. Este control de la actividad se debe a que estas células Schwann+ producen TGF β latente, permitiendo así que se mantenga la normal actividad proliferativa de las HSC (Yamazaki et al, 2011).

Por otro lado, nos encontramos también reguladores negativos como es el caso de los adipocitos. Estas células han demostrado estar presentes en la médula de manera inversamente proporcional a la cantidad y actividad de las HSC. La infiltración de grasa en la médula roja provocada por procedimientos como la quimioterapia o irradiación, hacía dudar si realmente eran reguladores negativos o se trataba simplemente de un mecanismo para ocupar el espacio que ocupaban previamente las HSC. Sin embargo, se descartó esta hipótesis con experimentos en ratones genéticamente incapaces de formar adipocitos, demostrando que en ellos las HSC incrementaban su habilidad para colonizar la médula así como su actividad proliferativa (Naveiras et al, 2009).

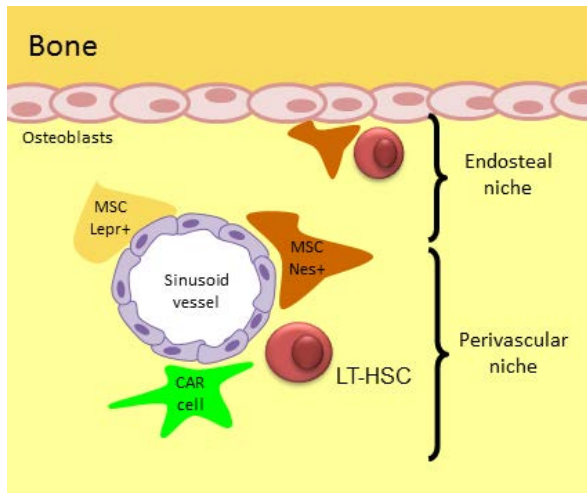


Figura 3:

Localización de las HSC en el nicho hematopoyético

3. Regulación epigenética de las células madre hematopoyéticas.

Como describíamos previamente, las principales características de las HSC, son la capacidad de auto-renovación y diferenciación. El correcto balance de estas dos funciones es crucial para el mantenimiento de la homeostasis durante la vida del organismo, ya que un exceso de auto-renovación podría perjudicar la reposición de las células sanguíneas, mientras que una tasa muy baja daría lugar con el tiempo a una deficiencia del reservorio de HSC. Los modificadores epigenéticos pertenecientes al complejo *Polycomb* contribuyen al equilibrio de estos mecanismos, desarrollando un importante papel tanto en el desarrollo de las HSC en el embrión, como en el mantenimiento y renovación de las HSC adultas.

3.1. Regulación de las HSC por el PRC1

En las últimas décadas son muchos los estudios basados en la utilización de modelos *knock-out* para distintas subunidades del PRC1 que nos ayudan a entender la regulación que estos ejercen sobre las HSC (Iwama et al, 2005). Hasta la fecha el componente del PRC1 mejor caracterizado en este sistema, es sin duda Bmi1. Este gen se encuentra sobre-expresado en una creciente lista de procesos tumorales hematológicos como linfomas, leucemias o síndromes mielodisplásicos, (Hosen et al, 2007; Merkerova et al, 2007). Adicionalmente, sus elevados niveles de expresión correlacionan con un peor pronóstico de tales patologías (Saady et al, 2014).

En los primeros trabajos publicados con HSC Bmi1-KO, trasplantes realizados con estas células procedentes de hígado fetal, demostraron que estas células sólo podían contribuir temporalmente a la repoblación hematopoyética, indicando la importancia de

este regulador epigenético (Park et al, 2003). No obstante, a pesar de ser considerado un importante regulador de la hematopoyesis en el desarrollo embrionario mediante la inducción en ESC del factor de transcripción Gata2, que es esencial para el desarrollo de este sistema (Ding L et al, 2012), diversos estudios han demostrado que su presencia es crucial para el correcto funcionamiento de las HSC adultas, pero no así para el desarrollo embrionario. Por el contrario, su deficiencia en HSC adultas, genera entre otras cosas defectos en su capacidad de auto-renovación (Iwama et al, 2004).

En nuestro laboratorio, desarrollamos un modelo de ratón condicionalmente KO para Bmi1, con el que pudimos abordar las consecuencias de su eliminación Bmi1 exclusivamente en el sistema hematopoyético primitivo. En este trabajo se observó que las células madre hematopoyéticas en médula ósea deficientes en Bmi1, estaban disminuidas tanto en frecuencia como en números absolutos con respecto a sus controles. Mediante distintos experimentos se demostró que este hecho era debido a que las HSC fallaban en su capacidad de auto-renovación y entraban en el ciclo celular de forma superior a lo habitual, manteniendo por tanto un reservorio insuficiente de HSC. Estas células además presentaban defectos en su funcionalidad, detectados al ser trasplantadas en recipientes letalmente irradiados y al observar que los animales Bmi1-KO morían a la temprana edad de 24-26 semanas. Adicionalmente, en la médula se encontró un incremento de los progenitores linfoides, atribuido a la incapacidad de diferenciarse correctamente a células B y T. La causa de este hecho se elucidó gracias a los análisis de expresión génica realizados en LSK Bmi1-KO, que determinaron que Bmi1 era un potente regulador de genes indispensables para el desarrollo linfóide como el factor Ikaros, Cd19 o IL7-R, que se mostraban sobre-expresados en los animales KO dada la ausencia de la marca represora H2AK119 frente a los controles, determinada por experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (Arranz et al, 2011).

3.2.Regulación de las HSC por el PRC2:

El papel del PRC2 en cuanto a su acción sobre el sistema hematopoyético, ha sido hasta el momento relativamente poco estudiado. Se ha visto por ejemplo que mutaciones heterocigóticas en Ezh2, Eed o Suz12, incrementan la actividad de los progenitores hematopoyéticos, sugiriendo que la acción normal del PRC2 sería restringirla (Mochizuki et al, 2011). Los hallazgos más interesantes que conciernen a este complejo, son aquellos en los que se investiga el papel de la histona metil-transferasa Ezh2.

Mutaciones en las que se activa Ezh2, han sido identificadas en grandes linfomas de células B originados en los centros germinales (Morin et al, 2010). Su actividad oncogénica también ha sido descrita en síndromes mielodisplásicos y leucemias agudas mieloides (Herrera-Merchán et al, 2012). Sin embargo, también se han encontrado mutaciones adquiridas en este gen en neoplasias mieloides, indicando su posible acción como un supresor tumoral. Por tanto, el desequilibrio en pro o en contra de la actividad metil-transferasa de Ezh2 puede tener un efecto bien oncogénico o bien protector frente al cáncer (Sashida and Iwama, 2004).

Para estudiar más en detalle estos efectos, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo condicional de ganancia de función para esta enzima en sistema hematopoyético desde las HSC. Los animales con sobreexpresión de Ezh2 mostraban un incremento en frecuencias y números absolutos de las LT-HSC y ST-HSC, mientras que los valores de MPP disminuían significativamente, encontrando además en ellos incrementados los niveles de apoptosis, al contrario que en las poblaciones de HSC quiescentes, que eran mayores en los animales con sobreexpresión de Ezh2. En cuanto a la diferenciación de estas células a progenitores unilíneas, se vio un incremento en la tendencia a progenitores mieloides en detrimento de los linfoides. Estos datos correlacionan con el fenotipo encontrado que muestra un desorden mieloproliferativo (MPD) en estos animales con desenlace fatal, caracterizados por la expansión mieloide excesiva en la médula ósea y en el bazo, recuento elevado de glóbulos blancos y células mieloides maduras, y esplenomegalia. Sin embargo, al sobreexpresar Ezh2 específicamente en el linaje mieloide, no tenía lugar este MPD, sino que el mecanismo que lo produce actúa concretamente en las HSC. La sobreexpresión de Ezh2, reprimía a genes como ATF4 o IKZF1, importantes marcadores de leucemias, mediante el aumento en sus regiones promotoras de la marca epigenética represiva H3K27me3. Por el contrario, otros genes como BGN o ANGPT1, conocidos inductores de senescencia, o el reclutador de histona metil-transferasas EVI1, se veían sobre-expresados en los animales KI-Ezh2 (Herrera-Merchán et al, 2012).

Por otro lado, se sabe que la delección de esta enzima en sistema hematopoyético primitivo, produce letalidad durante el desarrollo embrionario, sin embargo, no impide la hematopoyesis adulta, aunque sí provoca severos defectos en la diferenciación linfóide (Su et al, 2002). Este hecho pudo atribuirse en un principio a la presencia de su proteína homóloga Ezh1, de la que previamente no se había descrito nada en cuanto a su

función en el sistema hematopoyético, por lo que estos estudios se convierten en cruciales para entender el mecanismo de acción del complejo PRC2.

4. Senescencia celular

El proceso de senescencia celular fue descrito a principios de los años 60 por Hayflick y Moorhead como el fin de la capacidad de replicación de las células mitóticas, utilizando fibroblastos humanos normales que entraban en un estado de detención del crecimiento irreversible tras varios pases seriados in vitro. Sin embargo no se veían afectadas su viabilidad ni su actividad metabólica. También observaron que esto no ocurría con las células cancerígenas (Collado et al, 2007). Actualmente, la senescencia se define como una detención del ciclo en respuesta a factores de crecimiento y otras señales que inducen el incremento de la proliferación celular.

Se postuló por los mismos autores, una serie de factores celulares que se iban modificando durante divisiones celulares consecutivas limitando esta capacidad de división, conocidos como *Hayflick factors*. Estos factores son el acortamiento de los telómeros que se produce cada vez que hay una nueva división celular, la acumulación de daño en el DNA durante las mismas, y la des-represión del locus Cdkn2a (Hayflick and Moorhead, 1961). Este locus es un regulador crítico de la senescencia, ya que las proteínas que codifica se acumulan durante la inducción de este fenómeno conduciendo a las células al estado de detención del crecimiento. Tanto el estrés replicativo como oncogénico conduce a su activación llevando a la célula al estado senescente (Serrano et al, 1997). Las proteínas que se codifican en él, son los supresores tumorales p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p19^{ARF} (p14 en humanos). Las dos primeras son ciclinas dependientes de kinasas, siendo su función la de regular el ciclo celular evitando la fosforilación de pRB, mientras que p19 se encarga de mantener estable el nivel de p53 previniendo su degradación (Simboeck et al, 2011). En esta tesis, el locus Cdkn2a representa un papel imprescindible debido a que es diana directa de los principales reguladores epigenéticos que forman el complejo *Polycomb*.

Al contrario que las células apoptóticas, las células senescentes permanecen viables sin actividad durante largos periodos. Este proceso de senescencia por tanto, provee a los organismos jóvenes y adultos de una protección frente al cáncer y otras patologías, ya que el impacto que las células senescentes causan sobre los tejidos es eficientemente reparado por el proceso normal de renovación celular (Collado et al, 2007). Sin embargo, en organismos con un daño genómico severo, o señales

permanentes de daño genómico (como el caso del modelo súper p53) (Garcia-Cao et al, 2002), el ratio de entrada en senescencia celular puede superar la tasa de renovación en las células madre.

Las proteínas que forman parte de tal complejo, son factores clave en los procesos de senescencia de las HSC. Esto es debido a la regulación transcripcional de su perfil pluripotente a través de los cambios epigenéticos. Dichos cambios, pueden modificar el destino de dichas células y afectar a la expresión de numerosos genes. Tradicionalmente el envejecimiento celular y el cáncer han sido vistos como síndromes genéticos debidos a la acumulación de daño genómico, Sin embargo, hoy sabemos que ambos fenómenos están acompañados de modificaciones epigenéticas. Alternativamente, las células madre pueden evadir la senescencia o la apoptosis mediante la formación de tumores, por lo que para uno u otro caso, es crucial el balance de los reguladores directos que forman el complejo *Polycomb* (Lessard et al, 2003).

En cuanto al principal componente del PRC1 que nos ocupa, Bmi1, ha demostrado tener un importante rol en este proceso senescente tras experimentos con fibroblastos mediante la represión principalmente de p16 y p15. Se comprobó que tanto fibroblastos como linfocitos deficientes en Bmi1, mostraban una marcada sobreexpresión de estos supresores tumorales así como la aparición de senescencia celular in vitro. Mientras que por el contrario, al aumentar la expresión de Bmi1 se producía la immortalización de los fibroblastos, disminuyendo los niveles de p16^{Ink4a} y p19^{ARF}, dando lugar a transformaciones neoplásicas (Jacobs et al, 1999). Por otro lado, al hablar del PRC2, cuya actividad es necesaria para la actividad del PRC1 canónico, se ha demostrado que Ezh2, la principal subunidad catalítica junto a Ezh1, se encuentra expresada en niveles bajos en las poblaciones celulares más senescentes, coincidiendo con una importante reducción de la marca epigenética H3K27me3 y por tanto el desplazamiento de Bmi1, permitiendo así una general activación transcripcional (Bracken AP et al, 2007). Sin embargo, la importancia de la histonmetiltransferasa Ezh1 en este proceso no se había descrito hasta el momento en ninguna población celular.

Objetivos

El objetivo global de este trabajo es el estudio de la regulación epigenética de las células madre hematopoyéticas y su nicho a través de Ezh1 y Bmi1, componentes del complejo Polycomb. Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

1. Evaluar y caracterizar un ratón knock-out para la enzima Ezh1 en el sistema hematopoyético más primitivo para deducir así la función específica y sus mecanismos moleculares que esta histonmetiltransferasa ejerce en la población de HSC adultas.
2. Establecer si existe una relación reguladora recíproca entre las HSC y el nicho hematopoyético mediada por el gen Bmi1 mediante la caracterización de ratones carentes de tal gen en ambos niveles.

Materiales y métodos

1. Mantenimiento y generación de animales

1.1. Estabulación.

Todos los ratones utilizados en la realización de ésta tesis se han mantenido en la Unidad de Medicina Comparada del CNIC de acuerdo a la legislación española sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1201/2005 y Ley 32/2007): Se han encontrado alojados en jaulas dentro de un sistema de “rack” ventilado, con una cama de viruta y material de nidificación suficiente, a la vez que la aportación de material y objetos en el interior de las jaulas como enriquecimiento ambiental. Todos los animales disponían de comida y agua “*ad libitum*” revisadas diariamente. El número máximo de animales por jaula estaba limitado y adaptado a la normativa vigente (Real Decreto 53/2013), permitiendo este espacio en cualquier caso que se satisficieran sus requerimientos fisiológicos. Del mismo modo, las condiciones ambientales de humedad y temperatura han sido las consideradas por dicha normativa para esta especie (temperatura, 20-24 °C; y humedad relativa, 45-65%), que se controlaron y registraron diariamente. Estos animales han sido asimismo alojados en un estatus sanitario libre de patógenos específicos (SPF), y todos los procedimientos animales realizados como parte del trabajo experimental han sido aprobados previamente por el Comité Ético del CNIC.

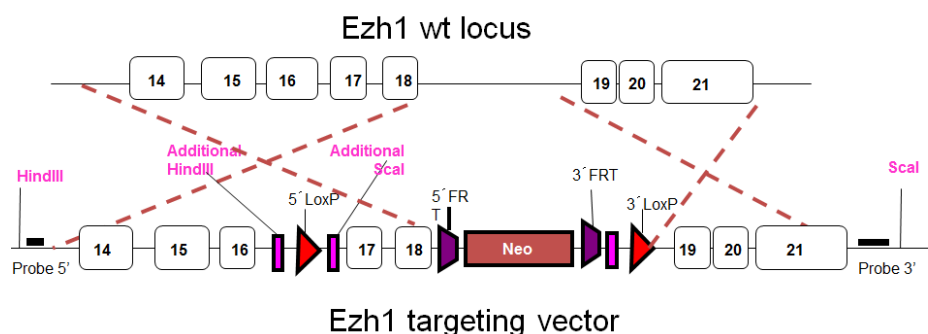
1.2. Modelos de ratón utilizados.

Para análisis de células o tejidos en condiciones *wild type* (wt) así como para realización de trasplantes, se escogieron indistintamente machos y hembras de la cepa C57/BL6. En algunos casos, sobre todo como receptores de trasplantes de médula ósea, los ratones empleados han sido del mismo fondo genético pero con la variable alélica CD45.1 (C57/BL6-SJL). En cuanto a los animales modificados genéticamente se utilizaron los que se describen en la siguiente tabla:

<i>Knock-out</i> condicionales	Cre-recombinasas	Otros
Ezh1 ^{f/f}	Vav-Cre	CXCL12 ^{GFP}
Bmi1 ^{f/f}	CreER ^{T2}	KFP ^{tg/+}
Cdkn2a ^{f/f}	Nestin-Cre ^{ER}	

1.3. Generación del ratón knock-out condicional para Ezh1.

Para la generación de los ratones condicionales knock-out para Ezh1 se diseñó y se generó el siguiente *targeting vector* que fue insertado en ESC mediante electroporación.



2. Procedimientos experimentales con animales *in vivo*

2.1. Inducciones con tamoxifeno en los animales de sistema Cre-recombinasa inducible.

Los animales de la línea CreER^{T2} y NestinCre^{ER} fueron inducidos con 4-hidroxitamoxifeno (Sigma), disuelto en etanol 100% a 10mg/ml y mezclado por sonicación con aceite de maíz (Sigma) hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Se les administró 150µl/día de 4-hidroxitamoxifeno a dicha concentración final por vía nasogástrica, una vez al día, durante 5 días consecutivos a las 4 semanas de edad.

2.2. Extracción y preparación de sangre y órganos hematopoyéticos.

Las extracciones de sangre periférica se han realizado por vía submaxilar en tubos de EDTA, obteniendo cantidades entre el 7,5% y el 10% del volumen total de sangre.

La extracción de los órganos hematopoyéticos timo y bazo se realizó tras el sacrificio en cámara de CO₂ de los animales, así como la extracción de las extremidades inferiores para posterior aislamiento de médula ósea. Estas extremidades pudieron ser limpiadas y fijadas para usar los huesos en análisis histológicos, o bien limpiadas para extracción de células de médula, extraídas en todos los casos por trituración con mortero de los fémures limpios. Posteriormente se disgregaron con pipeta y una solución tampón

consistente en PBS estéril 1x con 0.5% BSA y 10mM HEPES. Después de esto se pasaron por filtros de nylon de 70µm de diámetro.

En los casos en los que se requería aislar o analizar las poblaciones de MSC y OBC, los huesos una vez abiertos en el mortero se trataron con una solución consistente en Liberase™ de Roche (1U/ml), DNase (0,5mg/ml) y HBSS 1x. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se filtraron y recogieron en la solución tampón previamente descrita hasta proceder con ellas, manteniéndose a 4°C hasta su siguiente uso en cada experimento.

Los órganos timo y bazo se extrajeron del animal sacrificado y en función de su siguiente uso, fueron fijados para un posterior análisis histológico, o bien homogeneizados y disgregados para su extracción celular. En éste caso, se aplastaron con ayuda de una jeringuilla en una placa Petri, y se disgregaron con una pipeta y PBS, para posteriormente filtrar y recoger la suspensión celular de la misma forma que se procedió con la médula ósea.

2.2.1. Lisis de eritrocitos: En los casos de sangre periférica, médula y bazo, una vez aisladas sus células, se procedía a lisar los eritrocitos. Para ello, las células obtenidas se centrifugaban para obtener un pellet, que se resuspendía según tamaño y número de células en un volumen determinado de “*ACK Lysis buffer*” (Lonza). Se mantenía en agitación a temperatura ambiente 2 minutos para médula y bazo y 10 minutos para sangre. Transcurrido este tiempo, se añadió en cada caso 10 veces su volumen de PBS frío y se volvió a centrifugar para limpiar la muestra de restos de eritrocitos. Posteriormente se procedía con el pellet según fuese necesario en cada caso.

2.2.2. Contaje de células: Tras obtener las células de cada órgano, para realizar el conteo de células totales de bazo, timo y médula se utilizó un contador automático “*CASY TT Cell Counter*” de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el caso de las muestras de sangre periférica, se utilizó el contador hematológico “*Pentra 80*”, operado por el personal de la Unidad de Medicina Comparada del CNIC.

2.3. Irradiación y trasplante de médula ósea.

Todos los animales recipientes, procedían de la cepa C57/BL6 (con las variables CD45.1 y CD45.2), y eran en su mayoría hembras de entre 8 y 12 semanas de edad, que fueron irradiados por el servicio de Bioseguridad y Radioprotección del CNIC y recibieron una dosis letal de 11Gy el día anterior a ser trasplantados.

2.3.1. Seriado

En cada caso se inyectaron un total de 2×10^6 células de médula total del donante en los recipientes wt previamente irradiados. Trascurridos dos meses de la realización del trasplante se irradian nuevos recipientes y se realiza un trasplante secundario con las células que previamente han repoblado la médula de los primeros.

2.3.2. Competitivo

Se inyectó en cada animal irradiado una cantidad de 1×10^6 de células de médula ósea del modelo transgénico a analizar y la misma cantidad del modelo wt. Es el experimento más común dentro de los trasplantes hematopoyéticos. Con él medimos el potencial de regeneración de las HSC de cada uno de los donantes frente a una médula control, en nuestro caso de animales wt CD45.1, para poder monitorizar más adelante la proporción de médula reconstituida por cada uno de los animales.

2.3.3. Homing

Las células a inyectar fueron marcadas con CFSE y se inocularon a los recipientes previamente irradiados 2×10^6 células negativas para el “*Biotin Lineage cocktail*” (Lin-) (véase apartado 4.2). Tras el trasplante fueron monitorizadas a las 6 y a las 24h mediante citometría de flujo, gracias a la fluorescencia del CFSE (488nm).

2.3.4. Inverso

Se inyectan 2×10^6 de células provenientes de médula total wt en un recipiente transgénico objeto del estudio en cada caso. En los casos en los que el recipiente era un modelo inducible, fue inducido con tamoxifeno siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 2.1., una semana después del trasplante.

3. Procedimientos experimentales con células MSC *ex vivo*

Las células MSC de médula, se extrajeron por triturado y posterior digestión con Liberase™ como se detalla en el apartado 2.2.

3.1. Aislamiento

Tras la extracción se sembraron las células obtenidas de la médula total en medio DMEM/F-12 con Glutamax de Invitrogen, complementado con un 10% de FBS inactivo y un 1% de P/S a una densidad de 25×10^6 c/ml en botellas de 25 cm², en los que se incuban a 37°C y 5% de CO₂ durante 8h. Tras ese tiempo retiramos parte de las células no adherentes y sustituimos el medio retirado por la misma cantidad de medio nuevo. 24h después se reemplazó todo el medio.

3.2. Expansión

Una vez que tuvimos las MSC extendidas y aisladas en el suelo de la botella, se tripsinizaron y se pasaron a botellas más grandes de 75cm², dónde les fuimos cambiando el medio cada 24h hasta que observamos la aparición de monocapa. En éste punto, y al llegar aproximadamente a un 80% de confluencia se volvieron a tripsinizar para sembrar a conveniencia según el siguiente experimento de entre los que se describen a continuación.

3.3. Ensayo de CFU-F

Para evaluar la capacidad formadora de colonias de las MSC, una vez expandidas y tripsinizadas fueron sembradas en medio DMEM-F12 con Glutamax completo en una densidad aproximada de 500c/cm². Fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 13 días. Después de ese tiempo las placas se fijaron con formaldehído al 10% durante una noche, y se tiñeron con tinción de Giemsa a dilución 1:20 (v/v) en agua entre 2 y 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua.

3.4. Ensayos de diferenciación

Tras tripsinizar las células obtenidas del paso 3.2 se sembraron 1×10^5 células en pocillos de placas M-96 en 200ul de DMEM-F12+Glutamax completo. Pasadas 12 horas se comprobó que las células estaban pegadas y se substituyó el medio actual por medio específico de diferenciación en cada caso:

a) Diferenciación Adipogénica: Utilizamos el medio provisto en el “*StemPro Adipogenesis Differentiation Kit*” de Gibco, y lo reemplazamos cada 2 días durante tres semanas. Transcurrido este tiempo retiramos el medio, lavamos con pipeta y PBS y se fijaron las células durante 10 minutos a temperatura ambiente con formaldehído al 10%. Volvimos a lavarlas dos veces con PBS, tras lo cual se añadió la solución de trabajo de Oil Red O preparada tras diluir tres partes de nuestra disolución stock (500mg ORO/ 100ml isopropanol) en dos de agua, dejar reposar 10 minutos a RT y pasar por papel de filtro. Incubamos las células con la tinción durante 15 minutos sin agitación y después se lavaron varias veces con agua. Tras la tinción se mantuvieron húmedas en PBS hasta la adquisición de imágenes en un microscopio *Olympus Nashirige* invertido de campo claro con cámara de color.

b) Diferenciación Osteogénica: En éste caso se utilizó el medio del “*StemPro Osteogenesis Differentiation Kit*” de Gibco, que fue renovado cada 48 horas durante 14 días. Pasado ese tiempo se retiró el medio y las células se lavaron con pipeta y PBS. Después se fijaron 10 minutos a temperatura ambiente con formaldehído al 10% y se lavaron de nuevo con PBS para teñirlas 15 minutos con una disolución de Alizarin Red al 2% en agua que presentaba un pH entre 4’1 y 4’3. Después se lavaron con agua varias veces y se mantuvieron húmedas en PBS hasta la adquisición de imágenes en un microscopio *Olympus Nashirige* invertido de campo claro con cámara de color.

4. Citometría de flujo: Paneles básicos de caracterización citométrica y otros experimentos

4.1. Equipamiento utilizado

Para la mayoría de los análisis citométricos se utilizó un equipo analizador *LSR Fortessa II* de *BD Bioscience* equipado con 4 láseres o el modelo *FACS Canto 3L*, también de BD, sitos ambos en la unidad de celómica del CNIC. En los citómetros analizadores se utilizó *BD FACSDiva* como software de adquisición.

A su vez, para la separación de células por citometría se utilizaron los separadores *FACSAria II* de BD o *SY3200* de Sony.

Todos los datos obtenidos fueron tratados con el software de análisis *FlowJo vX*.

4.2. Relación de anticuerpos utilizados

Id.	Anticuerpo	Conjugado con:	Clon:	Compañía
1	CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	BD Pharmingen
2	CD45.1	PerCP-Cy5.5	A20	BD Pharmingen
3	CD45.2	Biotina	104	BD Pharmingen
4	CD3	Biotina	145-2C11	BD Pharmingen
5	CD4	PE	H129.19	BD Pharmingen
6	CD8	APC	53-6.7	BD Pharmingen
7	B220	Alexa647	RA3-6B2	BD Pharmingen
8	F4/80	PE-Cy7	BM8	Biolegend
9	Ly6G	PE	1A8	BD Pharmingen
10	cKIT	PerCP-Cy5.5	2B8	Biolegend
11	Sca-1	PE-Cy7	D7	BD Pharmingen
12	CD48	Biotin	HM48-1	eBioscience
13	CD48	PE	HM48-1	BD Pharmingen
14	CD150	Alexa647	TC15-12F12.2	BD Pharmingen
15	CD34	Alexa647	RAM34	BD Pharmingen
16	CD135	APC	A2F10.1	BD Pharmingen
17	CD135	PE	A2F10.1	eBioscience
18	CD16/32	AF 700	93	eBioscience
19	CD127	PE	A7R34	eBioscience
20	IgM	FITC	Policlonal	Caltag
21	CD43	Biotina	R2/60	eBioscience
22	PDGFRa;	APC	APA5	BD Pharmingen
23	CD31	APC	390	Biolegend
24	CD31	Biotina	MEK13.3	BD Pharmingen
25	CD51	Biotina	RMV-7	Biolegend
**	Biotin Lin. cocktail	Mix: CD3; B220; F480; Ter119; Ly6G		BD Pharmingen

Se han usado como anticuerpos secundarios, estreptavidinas conjugadas con Alexa Fluor 750, FITC y Alexa647 de Invitrogen.

4.3. Paneles básicos de caracterización citométrica

Órgano	Tipo celular		Inmunofenotipo
Médula ósea	LSK (Lin-cKIT+Sca1+)	SLAM	Lin-cKIT+Sca1+CD150+CD48-
		LT-HSC	Lin-cKIT+Sca1+CD135-CD34-
		ST-HSC	Lin-cKIT+Sca1+CD135-CD34lo
		MPP	Lin-cKIT+Sca1+CD135+CD34lo
	MP	CMP	Lin-cKIT+Sca1+CD16/32-CD34-
		GMP	Lin-cKIT+Sca1+CD16/32loCD34lo
		MEP	Lin-cKIT+Sca1+CD16/32+CD34lo
	CLP		Lin-cKIT ^{lo} Sca1 ^{lo} CD127+
	EC		CD45-Ter119-Sca1+CD31+
	MSC		CD45-Ter119-Sca1+CD31-CD51+
	OBC		CD45-Ter119-Sca1+CD31-CD51-
Bazo	Linfocitos B		CD45+Ter119-B220+
	Granulocitos		CD45+Ter119-Ly6G+
	Macrófagos		CD45+Ter119-F4/80+
Timo	Linf. T colaboradores		CD45+CD4+CD8-
	Linf. T dobles positivos		CD45+CD4+CD8+
	Linf. T citotóxicos		CD45+CD4-CD8+
	Linf. T dobles negativos		CD45+CD4-CD8-
Sangre periférica	Linfocitos B		CD45+Ter119-B220+
	Linfocitos T		CD45+Ter119-CD3+
	Linfocitos T colaboradores		CD45+Ter119-CD3+CD4+
	Linfocitos T citotóxicos		CD45+Ter119-CD3+CD8+
	Granulocitos		CD45+Ter119-Ly6G+

4.4. Análisis de Proliferación celular mediante incorporación de BrdU

A cada animal se le inyectaron 150µl de BrdU disuelto en PBS estéril a 10mg/ml por vía intraperitoneal. Los animales inyectados fueron sacrificados 24 horas después, y se les extrajeron las extremidades inferiores para el posterior aislamiento de células de médula ósea como se describe en el apartado 2.2. Una vez obtenidas, se recogieron 10⁷ por muestra y se marcaron con los anticuerpos para LSK en una dilución 1:100 incubándose durante 30' a 4°C en oscuridad. Se lavaron las células con PBS frío y centrifugamos a 1500 rpm, 4°C durante 10'. Se volvió a marcar en las mismas condiciones con el anticuerpo secundario (estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 750) en dilución 1:500. Tras el lavado del segundo anticuerpo, se utilizó el “APC BrdU Flow Kit” de BD PharmingenTM según instrucciones del fabricante, por las cuales se fijan y permeabilizan las células. Posteriormente se les realiza un tratamiento con DNasa (300 µg/ml durante 1 hora en baño a 37°C) antes de ser marcadas con el anti-BrdU, anticuerpo intracelular provisto en el kit y conjugado con APC. Se añadió el marcador de viabilidad 7AAD y se analizó en el citómetro con una velocidad de flujo baja.

4.5. Discriminación de las fases G₀/G₁ mediante Pyronina Y en las LT-HSC

Este experimento se realizó específicamente para las células LT-HSC. Para ello se sacrificaron los animales y se extrajeron y marcaron las células de médula con los anticuerpos correspondientes. Posteriormente se separaron las LT-HSC mediante citometría de flujo siendo recogidas directamente en “disolución de tinción” (HBSS + 10% FBS + 20mM HEPES + 50µM Verapamilo) previamente preparado.

Se prepararon adicionalmente dos tubos control por muestra: el primero se tiñó sólo con Hoescht 33342 y el segundo exclusivamente con Pyronina Y. Lavamos las células de cada tubo con “disolución de tinción” centrifugando 10 minutos a 4°C y 300g. Tras este lavado se añadió “disolución de tinción” que contenía Hoescht33342 en una concentración final de 5ug/ml (excepto a los controles de Pyronina), hasta alcanzar una concentración celular de 2x10⁶c/ml “disolución de tinción”. Se dió un vortex intenso a los tubos y se dejaron incubar a 37°C durante 45 minutos en un baño sin alteración de temperatura y en oscuridad, dando un nuevo vortex cada 15 minutos.

Trascurrido este tiempo y sin lavar las células se añadió la Pyronina Y a una concentración final de 1µg/ml a todos los tubos, excepto a los controles de

Hoescht33342 y se volvió a repetir la incubación de 45 minutos en el baño de la misma forma que en el paso previo.

Al terminar esta incubación las células fueron lavadas con 5ml de “disolución de tinción” fría y centrifugadas durante 10 minutos a 4°C y 300g. Se resuspendieron las células en 300µl de “disolución de tinción” y se mantuvieron en hielo hasta la adquisición en el citómetro, momento en el que se añadió yoduro de propidio (1:1000) para excluir las células muertas del análisis.

4.6. Análisis de Apoptosis

Tras el sacrificio de los animales se extrajo su médula como se ha descrito previamente (ver 2.2), y para cada uno se contaron 5×10^6 células en 500µl de PBS. Posteriormente las células se lavaron dos veces en PBS, añadiendo 1ml y centrifugando durante 10 minutos a 4°C y 1500rpm. Una vez obtenidos esos pellets de células se resuspendieron en 195µl de “solución de unión” *Ix* previamente preparado (10mM HEPES/NaOH, pH 7.4; 140mM NaCl; 2,5mM CaCl_2), que va a ser el que provee el Ca^{2+} necesario para que la AnexinaV-FITC se una a los residuos de fosfatidilserina. En esta solución se añadieron 5µl de AnexinaV-FITC y se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Se lavaron de nuevo las células añadiendo 1ml de “solución de unión” y centrifugando durante 10 minutos a 4°C y 1500rpm y posteriormente se marcaron con los anticuerpos de LSK en una dilución 1:100 (en “solución de unión”) y se incubaron durante 30' a 4°C en oscuridad. Se lavaron las células con “solución de unión” frío y centrifugamos a 1500 rpm, 4°C durante 10'. Se volvió a marcar en las mismas condiciones con el anticuerpo secundario (estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 750) en dilución 1:500 (en “solución de unión”). Después de lavar este segundo marcaje, se añadió Hoescht33358 a una concentración final de 10µg/ml y se analizó en el citómetro.

4.7. Análisis actividad betagalactosidasa (FACSgal)

Se extrajeron las células totales de médula y tras contaje y lisis de eritrocitos se recogieron 20×10^6 células por muestra divididas en dos tubos cada una de ellas, las cuales se centrifugaron (10' a 1500rpm y 4°C) y cada pellet se resuspendió en 1ml de solución de reacción previamente preparado (DMEM + 10% FBS + 20mM HEPES

pH=7.4). A un tubo de cada muestra le añadimos 1,65µl de C₁₂FDG, que teníamos previamente diluido a 20mM en DMSO, de manera que quedaba en una concentración final de 33µM, y tanto los tubos control (sin C₁₂FDG) como los experimentales se incubaron en baño a temperatura constante de 37°C y oscuridad durante 30 minutos. Para detener la actividad enzimática, tras este periodo de incubación las células se pasaron inmediatamente a hielo y se lavaron con PBS centrifugando a 4°C y 1500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se realizó su marcado con los anticuerpos necesarios para detectar las LSK y sus subpoblaciones según el procedimiento habitual y siempre en frío para inhibir la actividad de la betagalactosidasa. Se añadió Hoescht33358 en dilución 1:10000 como marcador de viabilidad y se analizó en el citómetro.

5. Técnicas de biología molecular

5.1. Extracción de ADN y genotipado de ratones

Todos los ratones fueron genotipados obteniendo el ADN de un fragmento de cola cortada a su destete (3-4 semanas). Tras digestión con proteinasa K, se extrajo el ADN mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con isopropanol y acetato amónico y se realizaron PCRs interpretadas por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

5.2. Extracción de ARN

El ARN se extrajo tanto de órganos completos como de pellets celulares mediante el reactivo *Trizol Reagent* de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante, por extracción con cloroformo y posterior precipitación por isopropanol.

5.2.1. Transcripción reversa a ADNc y RT-PCR

Para la retro-transcripción del ARN obtenido a ADNc, se utilizó el *High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems* siguiendo instrucciones del fabricante, y una vez obtenido el ADNc se analizó la expresión génica mediante RT-PCRs utilizando Sybr-Green.

5.2.2. Análisis de expresión génica

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo en la unidad de genómica del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas), usando el *Agilent Whole Mouse Gene Expression Microarray* (60K format) con ARNs marcados extraídos de células LSK-SLAM de animales Ezh1-KO y controles. Se compararon los niveles de expresión génica entre los distintos genotipos, considerándose diferencialmente expresados aquellos genes que entre control y Ezh1-KO presentaban un fold change > 1.50 y el p_{valor} ajustado <0.05.

5.3. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Las células se separaron mediante citometría de flujo y fueron fijadas con una concentración final de formaldehído al 1% durante 15' a temperatura ambiente. La fijación se detuvo añadiendo glicina a una concentración final de 0,125M. Tras ello se lisaron en solución de lisis (1% SDS, 10mM EDTA y 50mM Tris-HCl a pH=8.0) y después se diluyeron en proporción 1:3 con Tritón-X100 al 1%, 2mM EDTA, 150mM NaCl y 20mM Tris-HCl a pH= 8.0 conteniendo inhibidores de proteasa. Después se preclarificaron con una mezcla de ADN de esperma de salmón, agarosa y proteína A y el ADN de los complejos precipitados fue amplificado mediante RT-PCR.

5.4. Extracción de proteína y western blot

Para cada órgano se obtuvieron las células como se describe en el punto 2.2 y se les extrajo la proteína total siguiendo el procedimiento estándar de purificación con “*Laemmli buffer*” y β -mercaptoetanol. Tras ello se separaron las proteínas mediante electroforesis en geles de acrilamida de distintas concentraciones y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa que posteriormente se bloquearon con BSA.

Estas membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios procedentes en cada caso a la concentración indicada por los fabricantes y posteriormente con anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados con HRP en dilución 1:10000. Tras las incubaciones y sucesivos lavados las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia usando el reactivo ECL de Amersham.

5.4.1. Relación de anticuerpos

Id	Anticuerpo	Clon	Compañía
26	anti-Ezh1	Policlonal	Abcam
27	anti-Bmi1	F6	Millipore
28	anti-EZH2	Ac22	Cell signalling
29	anti-Eed	AA19	Millipore
30	anti-Suz12	SUZ220A	Abcam
31	anti-H3K27me3	mAbcam6002	Abcam
32	anti-H3K27me2	Policlonal	Abcam
33	anti-H3K27me1	Policlonal	Abcam
34	anti- β -actin	AC-74	Sigma
35	anti-p16	EP1551Y	Genetex
Anticuerpos secundarios:			
**	HRP-linked anti-mouse IgG	Policlonal	DAKO
**	HRP-linked anti-rabbit IgG	Policlonal	DAKO

6. Técnicas histológicas

6.1. Tinciones morfológicas e inmunohistoquímicas en secciones de tejido

Para la realización de secciones histológicas, los tejidos fueron fijados en formaldehído al 4% previamente a su incursión en parafina, y adicionalmente los fémures fueron descalcificados con inmunocal durante 26 horas. De los bloques obtenidos se cortaron secciones de 4,5 μ m que fueron utilizados tanto para tinciones con hematoxilina-eosina y Oil Red O como para inmunohistoquímica.

En el caso de las inmunohistoquímicas se utilizaron los anticuerpos anti-Ezh1, anti-Bmi1, anti-p16Ink4a, anti-p19, anti-Dcr2, anti-Ezh2, anti-p15Ink4b, y anti-Ki67 (Ab-2; Neo-Markers).

6.2. Tinción directa de Oil Red O en médula

Para este experimento se fijaron los fémures de los animales en PFA al 4 % durante 12h y posteriormente se congelaron en OCT. Con la ayuda de un criostato Leica motorizado, se devastaron los laterales del hueso hasta obtener secciones de aproximadamente 1mm de grosor. Dichas secciones se lavaron con PBS para limpiar el OCT y posteriormente fueron inmersas durante 10 minutos en isopropanol al 60% antes de ser embebidas en la disolución de trabajo de Oil Red O detallada en el apartado 3.2.4

durante al menos 30 minutos. Después se lavaron de nuevo en isopropanol y se conservaron en PBS hasta su adquisición en el microscopio.

6.3. Análisis actividad betagalactosidasa

Para determinar el nivel de senescencia mediante técnica de tinción histológica en tejidos, se utilizó el *Senescence β -galactosidase Staining Kit* de Cell Signalling preparando la muestra y siguiendo las instrucciones del fabricante. Al extraer las médulas y bazo de los animales fueron embebidos en OCT frío y congelados, tras lo cual realizamos secciones de 5 μ m de grosor con el criostato que se conservaron a -20°C hasta su utilización para la tinción. Para iniciar el proceso hubo que atemperar los portas unos 30 minutos antes de comenzar y posteriormente lavar tres veces con PBS para limpiar el OCT. Tras ello añadimos la “*Fixative solution*” provista por el kit e incubamos a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Posteriormente se añadió *β -Galactosidase staining solution* sobre la totalidad del tejido y se cubrió con un trozo de parafilm con el objeto de evitar su evaporación. En estas condiciones, los portas se incubaron durante toda la noche a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad. Al día siguiente se lavaron con PBS y se tiñeron con Fast Red de Sigma mediante el procedimiento estándar para ver núcleo y citoplasma y se montaron con DPX.

7. Análisis estadístico.

Los resultados de los experimentos fueron analizados con los programas *Microsoft Excel* y *Graphpad Prism 5*, mediante el test de Student (t-test). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de probabilidad (p) fueron iguales o inferiores a 0,05.

Resultados

Capítulo 1: Regulación epigenética de las HSC por la histona metiltransferasa Ezh1.

Teniendo en cuenta la pérdida incompleta de trimetilación en la H3K27 en células madre embrionarias nulas para Ezh2 (Shen et al., 2008), los fenotipos relativamente débiles hallados en distintos tejidos sin Ezh2 (Chen et al., 2009; Ezhkova et al., 2009; Mochizuki et al., 2011; Pereira et al., 2010; Su et al., 2003) y los patrones inversos de expresión que Ezh2 y su proteína homóloga Ezh1 presentan durante el desarrollo embrionario (Margueron et al., 2008), nos planteamos que Ezh1, prácticamente desconocida hasta el momento, podría actuar como un regulador homeostático en las HSC adultas. Por todo ello, en este trabajo se desarrollan las herramientas necesarias para determinar las consecuencias de eliminar esta proteína en el sistema hematopoyético más primitivo y establecer los mecanismos de acción de la misma.

1. Expresión endógena de la histona-metiltransferasa Ezh1 en HSC jóvenes y envejecidas.

Debido a que durante el envejecimiento de las HSC se ha observado una desregulación en los niveles de expresión de varios genes del complejo Polycomb involucrados en la remodelación de la cromatina (Chambers et al., 2007), nos planteamos que la actividad histon-metiltransferasa podría estar coordinada entre las proteínas Ezh1 y Ezh2 en las poblaciones jóvenes y envejecidas de HSC.

Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar se midieron los niveles de expresión mediante ARN mensajero en la población más primitiva de las células madre hematopoyéticas: las LT-HSC. Estas células fueron obtenidas de médula ósea en ratones wild type (wt) de la cepa C57BL/6 de 8 y 50 semanas de edad. Mientras que los niveles de Ezh1 fueron 3 veces más altos en las células de 50 semanas, no se observaron diferencias en los niveles de Ezh2 (Fig. 1A). Los mismos resultados fueron obtenidos en cuanto al nivel de expresión proteica mediante la técnica de *western blot*, en la que tampoco vimos diferencias en la expresión de otros miembros del PRC2 como Eed o Suz12 (Fig. 1B).

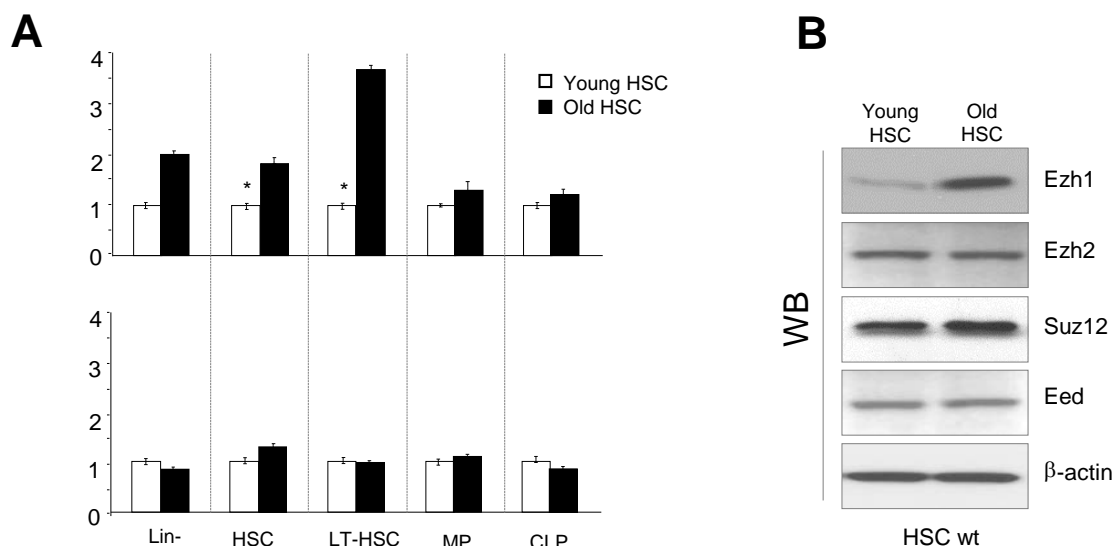


Figura 1: Expresión de Ezh1, Ezh2 y otros miembros de PRC2 en distintas poblaciones de HSC wt jóvenes y envejecidas.

A) Expresión de las proteínas Ezh1 y Ezh2 en distintas subpoblaciones de células hematopoyéticas de 50 y 8 semanas en médula ósea, aisladas por sus marcadores citométricos. Los resultados fueron normalizados por β -actina y se muestra el resultado de la expresión de los animales envejecidos con respecto a los jóvenes (medias \pm SD; n=12, *p<0,05).

B) Western blot representativos realizados sobre HSC aisladas de ratones wt de 8 y 50 semanas de edad. Se utilizó como control β -actina y se analizaron las expresiones de distintos miembros del PRC2: Ezh1, Ezh2, Eed y Suz12)

2. Generación de un alelo murino con delección condicional para Ezh1.

Para abordar correctamente nuestra hipótesis de trabajo, se generó un ratón portador de un doble alelo *knockout* condicional para Ezh1 en el que los exones codificantes del dominio SET catalítico se encuentran flanqueados por secuencias loxP. Estas secuencias son reconocidas por la enzima cre-recombinasa, que actúa retirando ese fragmento de DNA de la secuencia a replicarse (Fig. 2).

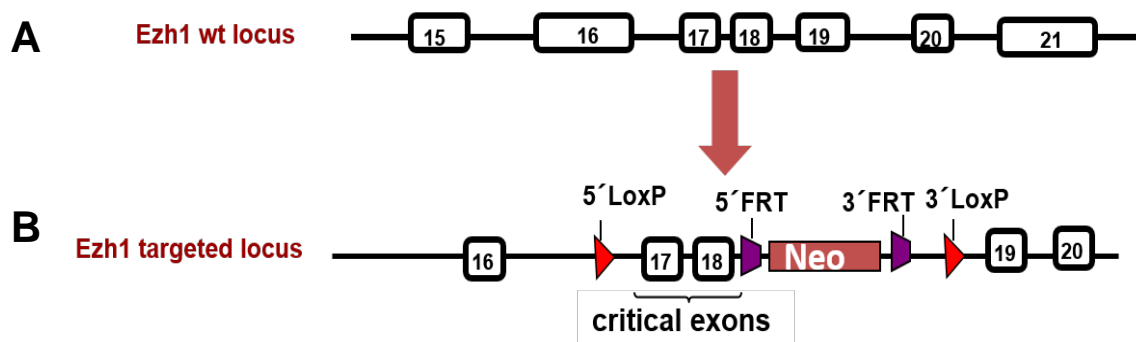


Figura 2: Esquema de las regiones exónicas de Ezh1 en su forma wt y modificada.

A) Locus genómico de Ezh1, en el que se representan los exones mediante cajas.

B) Locus modificado de Ezh1, en el que se incluyen las secuencias LoxP representadas por flechas rojas, siendo el fragmento comprendido entre ellas, retirado del proceso transcripcional por la enzima Cre-recombinasa.

Para generar la delección del dominio SET en el sistema hematopoyético más primitivo, se cruzó este ratón condicional con un ratón con un transgén de Cre-recombinasa expresado bajo el promotor Vav (Georgiades et al., 2002; de Boer et al., 2003). De esta forma, obtenemos los ratones delecionados para Ezh1 en las células progenitoras hematopoyéticas localizadas en la médula, así como en la mayor parte de células diferenciadas que constituyen los órganos hematopoyéticos y derivan de estas ($Ezh1^{f/f}VavCre^{tg/+}$, de aquí en adelante Ezh1-KO) y sus correspondientes controles, hermanos de camada sin el transgén ($Ezh1^{f/f}VavCre^{+/+}$, de aquí en adelante Control).

El correcto funcionamiento del sistema fue comprobado mediante RT-PCR en la población separada por citometría de flujo de HSC (LSK CD150⁺CD48⁻), en el que se observó una absoluta delección de Ezh1, descartando cambios de expresión en su homólogo Ezh2 y presentando un aumento de los supresores tumorales p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y ARF (Fig. 3A).

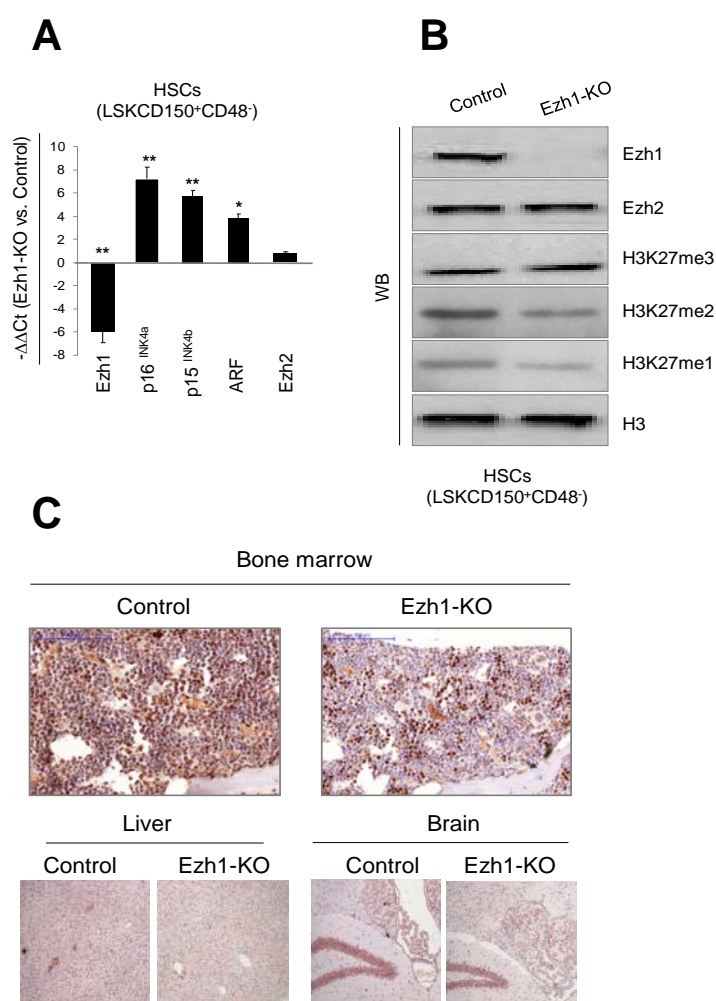


Figura 3: Análisis de la expresión de Ezh1 en animales control y Ezh1-KO.

A) Análisis por RT-PCR de la expresión de Ezh1, Ezh2, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, y ARF, se muestra el -ΔΔCt de las HSC-SLAM del ratón Ezh1-KO en relación al del Control. Los resultados fueron normalizados con los niveles de β-actina (medias ±SD, n=12, **p<0,001, p<0,05).

B) Western blots representativos en los que se evaluaron los niveles de expresión de las HSC-SLAM del ratón Ezh1-KO y Control frente a H3, de las proteínas Ezh1 y Ezh2 y sus marcas epigenéticas mono-, di- y trimetilación de la histona 3 en la lisina 27.

C) Tinciones inmunohistoquímicas de Ezh1 en secciones de parafina de médula ósea y tejidos no hematopoyéticos: hígado y cerebro.

A su vez, por western blot también se chequearon los niveles de Ezh1 y Ezh2, así como las marcas epigenéticas de las que ambas proteínas son responsables: la metilación de la histona 3 en la lisina 27, observando que la trimetilación no estaba alterada en las HSC de los ratones Ezh1-KO pero sí los niveles de mono y dimetilación que se mostraron notablemente inferiores a los del control (Fig. 3B).

También se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para Ezh1, en médula ósea así como en hígado y cerebro para descartar que el sistema afectase a órganos no hematopoyéticos. Efectivamente tanto en hígado como en cerebro, Ezh1 se mostraba sin diferencias entre los animales Ezh1-KO y sus controles. Sin embargo, sí se detectó que su expresión era nula en la mayoría de células de la médula de los animales Ezh1-KO en comparación con la de los controles, manteniéndose cierta presencia en las células del estroma y de tejidos no hematopoyéticos presentes en la cavidad ósea (Fig. 3C).

3. Evaluación de los efectos en médula ósea en ausencia de Ezh1 en HSC.

Posteriormente se analizaron los efectos que se pudieran ocasionar en la médula por la ausencia de Ezh1 en las poblaciones primitivas de HSC. En primer lugar se realizó tinción histológica de H&E, comprobando que había una severa hipoplasia medular en el animal sin Ezh1. Este dato fue corroborado por conteo directo de células totales de médula por fémur (Fig. 4).

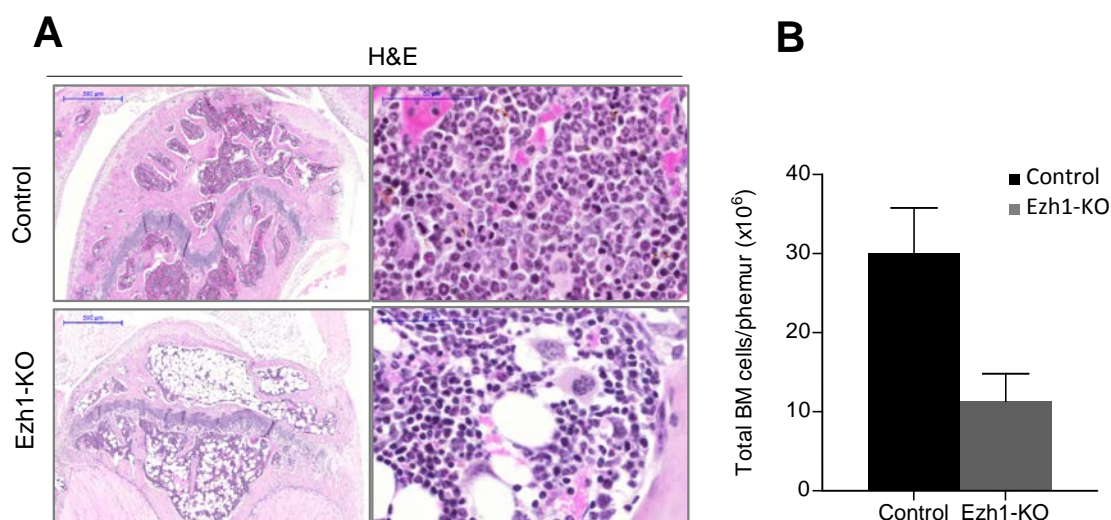


Figura 4: Caracterización general de los efectos en médula ósea de la delección de Ezh1 en HSC.

A) Caracterización histológica de secciones de médula ósea embebidas en parafina de animales Ezh1-KO y Control mediante tinción de H&E. Las barras de escala representan 500 y 50um en izquierda y derecha respectivamente.

B) Contaje absoluto de células de médula ósea por fémur para los animales control y Ezh1-KO, se muestran medias \pm SD (n = 10).

Tras esta visión macroscópica de los efectos sobre la médula, ahondamos en el análisis por citometría de flujo de las poblaciones hematopoyéticas, desde las HSC hasta los primeros progenitores diferenciados, progenitores linfoides comunes y mieloides (CLP y CMP). Se observó significativamente disminuida tanto la frecuencia, como los valores absolutos de las tres subpoblaciones analizadas de las HSC (LT-HSC, ST-HSC, MPP) en los ratones *Ezh1*-KO frente a su control. El mismo resultado se obtuvo al comprobar la fracción positiva para los marcadores SLAM de las HSC [59] (Fig. 5A). En este mismo análisis, se observó una importante disminución de CLPs en ausencia de *Ezh1*, mientras la población de CMP no se vio afectada ni en frecuencia ni en números absolutos (Fig. 5A).

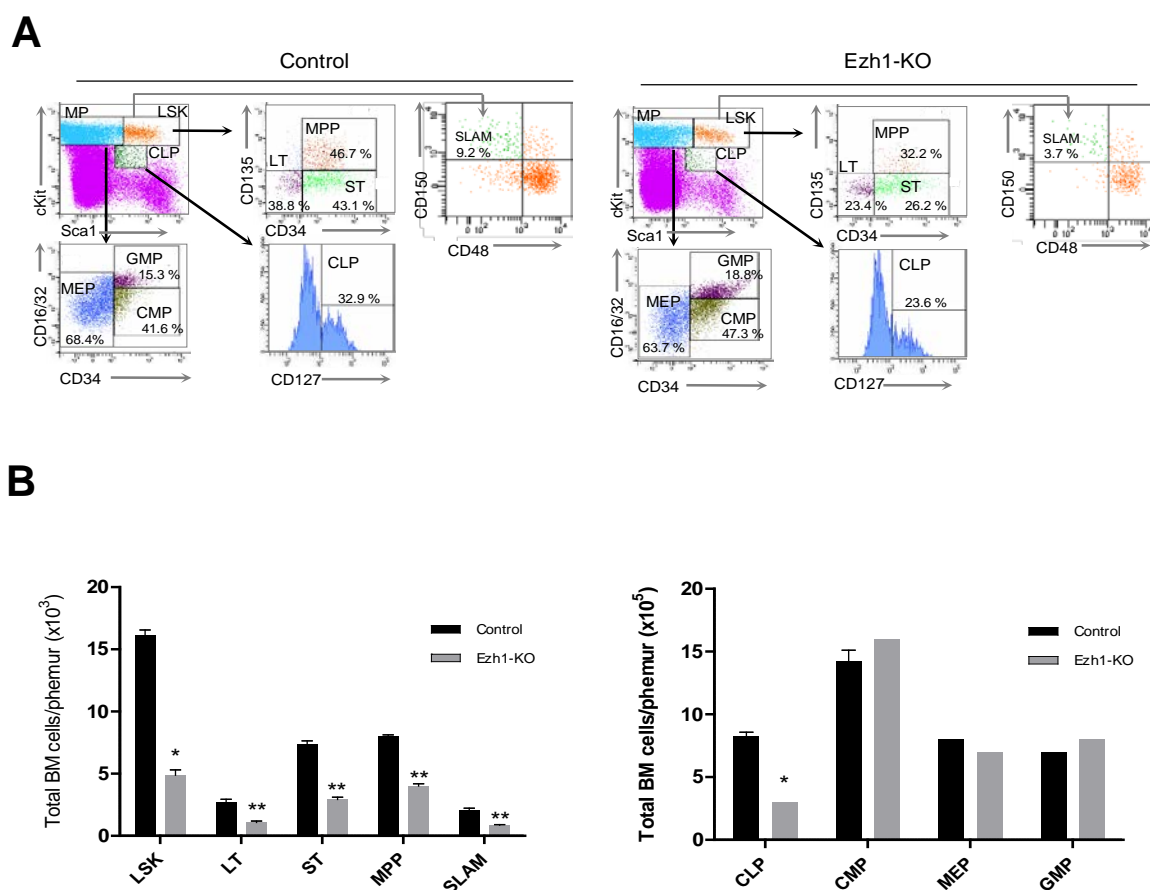


Figura 5: Análisis de las poblaciones de HSC y progenitores hematopoyéticos en médula ósea de los animales control y Ezh1-KO.

A) Paneles representativos del análisis por citometría de flujo de las células de médula ósea de los ratones *Ezh1*-KO y sus controles. Se analizaron 5 animales de cada genotipo en al menos tres experimentos independientes. Los números sobre los paneles indican el porcentaje sobre el total de células de médula nucleadas, excepto en el caso de la clasificación de LSK, dónde se indica el porcentaje del total de dicha fracción.

B) En los gráficos se indican números absolutos por fémur de cada una de las poblaciones arriba mostradas, siendo los datos medias \pm SD ($n = 10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

4. Análisis de la capacidad de repoblación de médula de las HSC deficientes en Ezh1.

Para determinar la capacidad de repoblación de las HSC carentes de Ezh1 se realizaron experimentos de trasplante competitivo. Para ello utilizamos un nuevo modelo proveniente de cruzar nuestro ratón KO-Ezh1 condicional con ratones transgénicos CreERT2. En este modelo, la Cre es un elemento de respuesta al tamoxifeno y actúa bajo el promotor de la RNA-Pol II, con lo que tras su inducción mediante esta droga, la delección de Ezh1 se produce en todo el organismo. Así obtuvimos este ratón (Ezh1-KO-ER) y sus correspondientes controles, procedentes de cruzar un ratón Ezh1^{+/+} con el mismo CreERT2 (Control-ER). Teniendo en cuenta que nuestros ratones Ezh1-KO-ER y Control-ER presentan la isoforma CD45.2, cada tipo de células se mezcló con células HSC de animales C57/BL6 (CD45.1) en proporción 1:1 y se realizaron experimentos de trasplante competitivo en ratones recipientes también C57/BL6 (CD45.1). Tras 12 semanas del trasplante, se analizó por citometría de flujo la sangre periférica de los ratones recipientes. Este marcaje nos reveló que hubo una eficiente repoblación de las células madre hematopoyéticas provenientes de los controles, mientras que no fue así en las células de médula Ezh1-KO-ER (Fig. 6). A las 16 semanas, se analizaron las poblaciones de progenitores en las médulas de los recipientes también por citometría de flujo y se observó cómo los ratones trasplantados con células del donante Ezh1-KO-ER, habían perdido prácticamente todas las HSC de esta procedencia (datos no mostrados). Estos experimentos demuestran que existe un defecto en cuanto a las capacidades de autorrenovación y de diferenciación de las HSC deficientes en Ezh1.

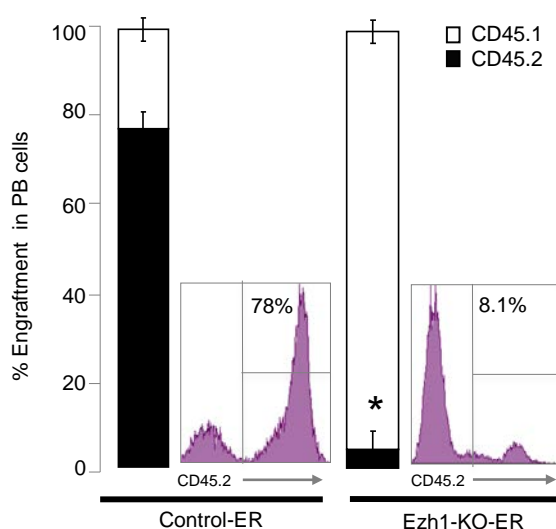
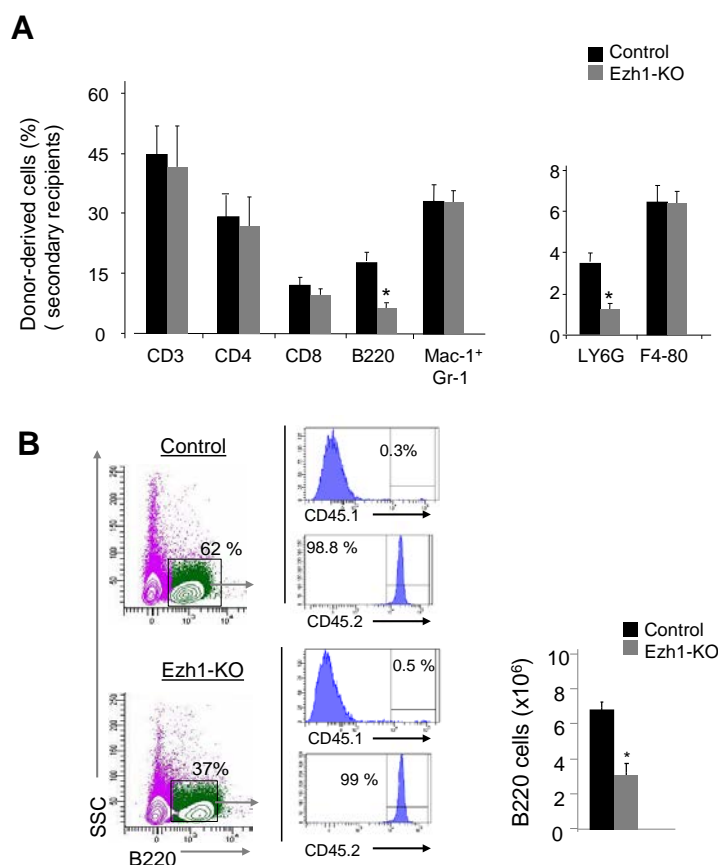


Figura 6: Caracterización de los recipientes de trasplantes competitivos de médula realizados con HSC control-ER y Ezh1-KO-ER.

Repoblación media del postrasplante competitivo en los ratones recipientes trasplantados con una mezcla 1:1 de las células CD45.1 y CD45.2 12 semanas después del trasplante en sangre periférica. Los datos muestran medias \pm SD (n = 8, *p < 0.05, **p < 0.001).

Por otro lado, para profundizar en si el impacto que la delección de *Ezh1* tiene sobre el mantenimiento de las HSC se debe de manera autónoma a un defecto originado en las mismas tras la eliminación de *Ezh1*, también se realizaron trasplantes seriados de médula ósea. Para esto utilizamos como donantes ratones *Ezh1*-KO y Control (CD45.2) y ratones recipientes C57/BL6-SJL (CD45.1) irradiados letalmente, a los que se les inyectaron HSC procedentes de nuestros modelos. De este modo se excluye cualquier posible efecto que la delección constitutiva de *Ezh1* en las HSC pudiera tener sobre el microambiente hematopoyético. Transcurridos dos meses, las HSC de los recipientes primarios se volvieron a extraer para ser trasplantadas en recipientes secundarios, cuya sangre periférica se analizó 4 semanas después del trasplante. Observamos que aquellos animales trasplantados con células *Ezh1*-KO, mostraban una cantidad significativamente menor que en los controles en algunos linajes sanguíneos, especialmente linfocitos B y granulocitos (Fig 7A). Esto indica por tanto una menor capacidad de regeneración de las HSC deficientes en *Ezh1* frente a las HSC control. En estos recipientes secundarios también se detectó un menor tamaño del bazo de los *Ezh1*-KO con respecto a los de los controles, que se vería explicado por una severa disminución en números totales de linfocitos B (Fig 7B).



*Figura 7: Análisis del trasplante seriado realizado con HSC *Ezh1*-KO y controles en sangre periférica y bazo.*

A) Porcentaje de células derivadas de los donadores (CD45.2) tras 10 semanas de la realización del secundario en distintas poblaciones de sangre periférica. Los datos muestran medias \pm SD (n = 8, *p < 0.05).

B) Porcentaje de linfocitos B en bazo de los recipientes secundarios tras su análisis a las 10 semanas de realizar el trasplante y porcentaje de células derivadas de CD45.1 y CD45.2 en cada caso. El gráfico muestra la media \pm SD (n = 8, *p < 0.05).

Pasados dos meses desde la realización del secundario se analizaron las médulas de los recipientes, y observamos que las HSC Ezh1-KO representaban aproximadamente un 10% de la médula total frente al 20% que lo hacían las del control (Fig. 8). Tras 16 semanas del trasplante secundario, las células control fueron capaces de repoblar a un tercer recipiente, mientras que los ratones trasplantados con células Ezh1-KO no llegaron a sobrevivir en este tercer ciclo, muriendo a la vez que los controles de irradiación (datos no mostrados).

Tras estos experimentos, podemos sugerir que Ezh1 es necesaria para el mantenimiento y renovación de las HSC, ya que el fallo originado en las mismas en los animales Ezh1-KO se produce exclusivamente debido a la eliminación de Ezh1.

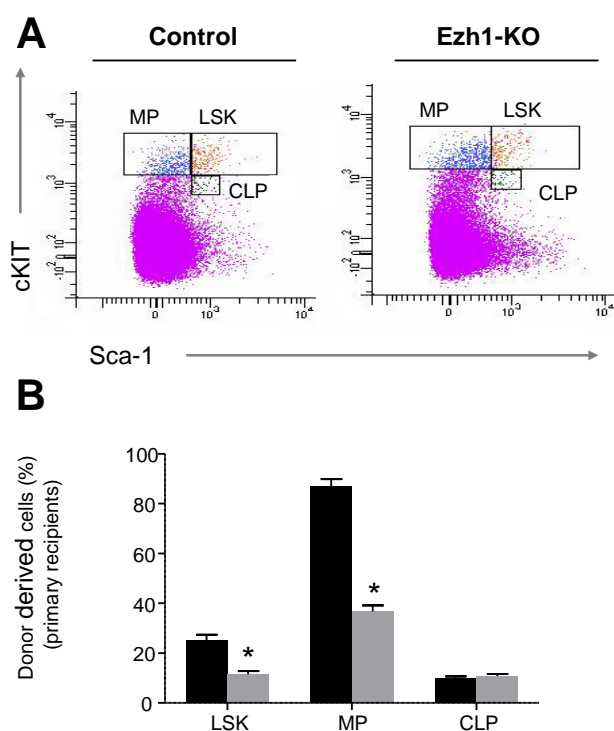


Figura 8: Contribución de las células del donante en las principales poblaciones progenitoras de médula ósea en trasplante seriado.

A) Paneles representativos del análisis citométrico de las poblaciones hematopoyéticas de los recipientes: LSK, MPP, CLP en MO.

B) Porcentaje de células derivadas de los donadores en cada trasplante. Los datos muestran medias \pm SD (n = 6, *p < 0.05).

Con el fin de evaluar la capacidad migratoria de las HSC en ausencia de Ezh1, realizamos ensayos de “homing”. Estos experimentos nos permiten medir la habilidad de las HSC para llegar a médula tras su inyección en un ratón recipiente en un periodo de tiempo determinado. Para ello las HSC Ezh1-KO y control fueron marcadas con CFSE, reactivo que se une espontánea e irreversiblemente a las proteínas celulares y permite su visualización posterior mediante citometría de flujo. Estas células se inyectaron en animales C57/BL6 letalmente irradiados y fueron analizadas 6 y 24h después, detectando que a ambos tiempos las HSC Ezh1-KO positivas para CFSE mostraron una menor capacidad migratoria frente a las células del control (Fig. 9).

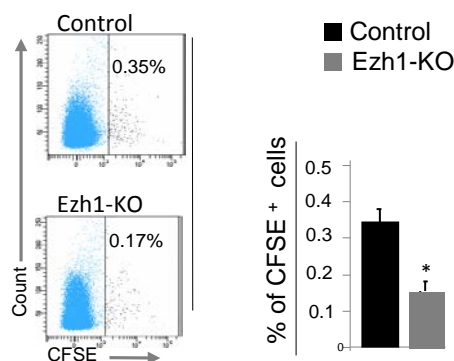


Figura 9: Análisis de la capacidad de migración de las HSC control y Ezh1-KO.

Análisis citométrico de médula ósea 24h después del trasplante con células marcadas con CFSE para determinar la capacidad de repoblación de las LSK Ezh1-KO. Los datos muestran medias \pm SD (n = 8, *p < 0.05) de dos experimentos independientes.

5. Caracterización de las HSC Ezh1-KO

En vista de que todos los resultados anteriores demostraban la disminución de HSC en ausencia de Ezh1, se realizaron varios experimentos para elucidar el motivo de esta drástica disminución, evaluando con ellos algunos parámetros como proliferación, quiescencia o muerte celular en las HSC que no expresaban Ezh1 y en sus respectivos controles.

En primer lugar hicimos dos ensayos de proliferación: por un lado realizamos una tinción inmunohistoquímica para el marcador Ki67 en secciones parafinadas de médula total, que revelaba una menor tasa de células positivas en los animales Ezh1-KO frente al control (Fig 10). Este resultado nos indica que las células sin Ezh1 presentan una menor actividad proliferativa que sus controles.

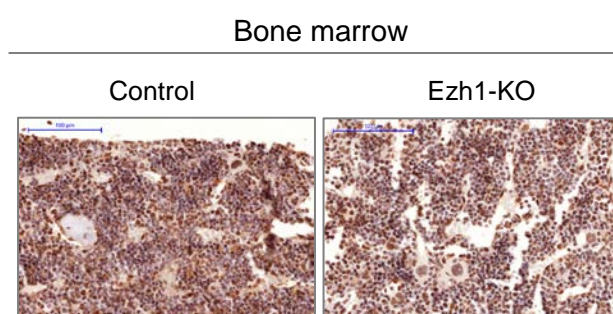


Figura 10: Evaluación de la proliferación celular en secciones de médula Ezh1-KO y controles.

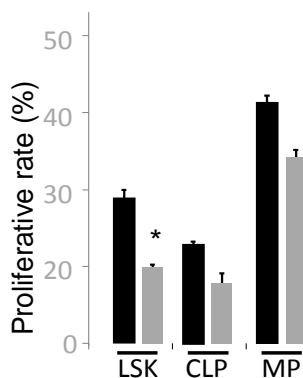
Caracterización inmunohistoquímica de secciones de médula embebida en parafina frente al marcador de proliferación celular Ki67. Las barras de escala representan 100 μ m.

Por otro lado, se realizó un análisis de ciclo celular mediante un ensayo de incorporación de BrdU. Este compuesto es un análogo sintético a la timidina que tras ser inyectado en el animal, se une a las nuevas cadenas de ADN sintetizadas en la fase S del ciclo celular. Transcurridas 24h de la inyección por vía intraperitoneal, se aislaron las HSC de los ratones Ezh1-KO y control y se analizaron por citometría de flujo. Para este análisis, se utilizaron los marcadores habituales para delimitar nuestras poblaciones de interés (Lin-, Sca1, cKIT), conjuntamente con un anticuerpo anti-BrdU para detectar su presencia en cada población. Los resultados de dicho análisis, para todas las

poblaciones analizadas (LSK, MP y CLP), muestran una menor cantidad de células proliferativas en los ratones *Ezh1*-KO frente a los controles (Fig. 11).

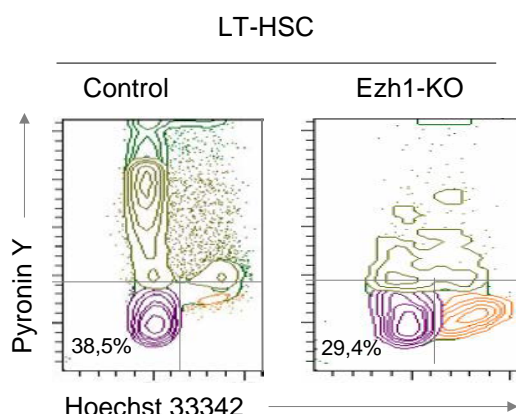
Con el ensayo de incorporación de BrdU, no podemos detectar diferencias significativas entre genotipos en

la fracción celular G_0/G_1 . Por lo tanto, con el objetivo de identificar exclusivamente la población de células quiescentes (G_0) hicimos un ensayo de tinción que combina Pironina Y con Hoechst33342 tiñendo las células adicionalmente con los marcadores habituales para la detección de las LT-HSC (Lin⁻, Sca1, cKIT, CD34 y CD135). Los resultados de este experimento demostraron que la fracción de LT-HSC quiescentes era significativamente mayor en los controles que en los *Ezh1*-KO (Fig. 12).



*Figura 11: Análisis del ciclo celular de los principales progenitores hematopoyéticos control y *Ezh1*-KO.*

Tasa de proliferación de las poblaciones LSK, CLP y MP medida por la incorporación in vivo de BrdU tras 24 horas. Se muestra media \pm SD (n=5 p<0,05).



*Figura 12: Cuantificación de las HSC controles y *Ezh1*-KO en fase de quiescencia.*

Análisis citométrico de la quiescencia (fase G_0) en las células LSK CD34⁻. Se muestran los paneles representativos del marcaje con Pironina Y y Hoechst 33342 en HSC control y *Ezh1*-KO. Los números muestran la media del porcentaje de células en G_0 en al menos en tres experimentos independientes, donde n=6, *p<0,05.

Para explicar la disminución cuantitativa de las HSC en las situaciones *Ezh1*-KO frente a los controles detectada en todos los experimentos, nos preguntamos si la apoptosis o muerte celular programada podría ser la causa de este fenómeno. Bajo esta hipótesis realizamos ensayos de Anexina V para distinguir las células que entran en procesos de apoptosis temprana en cada subpoblación de HSC primitivas (LT-HSC; ST-HSC y MPP). Con ellos pudimos observar que no había diferencias en la frecuencia de células apoptóticas entre los diferentes genotipos para ninguna de las tres subpoblaciones analizadas, con lo cual sugerimos que la muerte celular programada no era la causa subyacente a la pérdida de HSC en los modelos *Ezh1*-KO ni a su

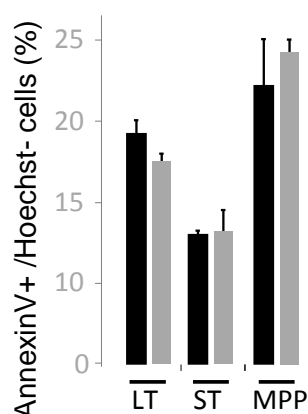


Figura 13: Análisis de apoptosis en HSC Ezh1-KO y controles.

Porcentaje de los eventos de apoptosis temprana en las subpoblaciones de HSC de los animales control y Ezh1-KO. Los datos muestran medias \pm SD (n = 6, *p < 0.05) de tres experimentos independientes.

incapacidad para competir con las células wt en experimentos de trasplante frente a los controles (Fig. 13).

Con los datos obtenidos en este grupo de experimentos, concluimos que en ausencia de la histon-metiltransferasa Ezh1, las HSC proliferan menos que

sus controles correspondientes y hay menos HSC en estado quiescente en los modelos Ezh1-KO frente a los controles. No obstante, hemos comprobado que este cambio no se debe a un aumento de la apoptosis en nuestros ratones Ezh1-KO.

6. Evaluación de senescencia en las HSC de los animales Ezh1-KO.

Todos los datos obtenidos hasta ahora, nos indican que en ausencia de la proteína Ezh1, las HSC proliferan menos que sus controles correspondientes y hay menos células en estado quiescente (HSC), no obstante, éste cambio no se debe a un aumento de la apoptosis en nuestros ratones Ezh1-KO. Estos datos unidos a la sobreexpresión detectada por RT-PCR de los supresores tumorales p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y ARF (Fig. 3) en las HSC Ezh1-KO frente a las del control, nos llevaron a preguntarnos si los responsables de estos fenotipos en las HSC Ezh1-KO eran mecanismos de senescencia celular.

Ante esta hipótesis, decidimos comprobar varios marcadores mediante tinciones inmunohistoquímicas en secciones femorales de médula Ezh1-KO y controles, analizando los supresores tumorales previamente mencionados (p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y ARF) junto a otros que también indican daño celular (γ H2AX) o senescencia (Dcr2). Observamos como todos ellos aumentaban en el modelo Ezh1-KO con respecto al control, sin alteración de otros principales componentes del complejo Polycomb como son Ezh2 o Bmi1 (Fig. 14).

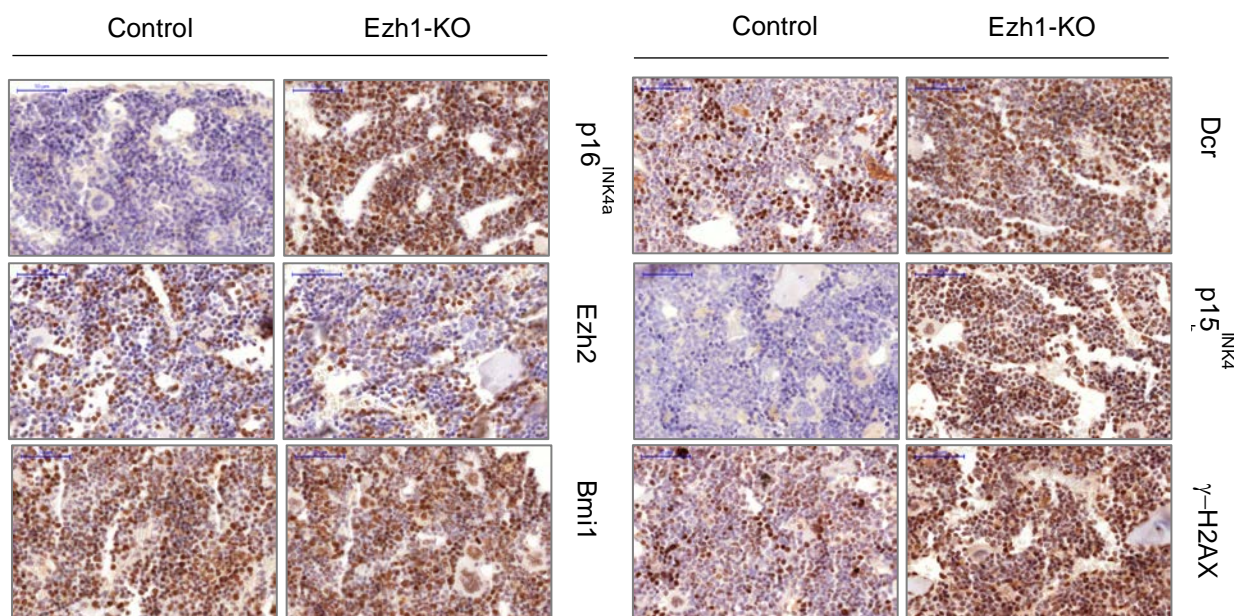


Figura 14: Tinciones inmunohistoquímicas en secciones de médula ósea Ezh1-KO y control para los principales marcadores de envejecimiento, daño celular y otros componentes de Polycomb.

Las tinciones para los marcadores de envejecimiento (p15 y p16), senescencia (Dcr2), daño celular (γ H2AX) Ezh2 y Bmi1 están realizadas sobre secciones del fémur en parafina previamente fijado y descalcificado. Las barras representan 50 μ m.

El indicador más ampliamente utilizado para valorar la senescencia celular, es la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -galactosidasa). Esta enzima presenta una actividad en los lisosomas que aumenta en los procesos de senescencia celular (Debaq Chebaux et al., 2009). Para su medición se utilizan principalmente dos métodos: el primero consiste en la tinción “in situ” de las células o el tejido fijado, con el sustrato cromogénico Xgal en condiciones de pH 6. Este sustrato, al ser hidrolizado en las células que presentan un alto grado de actividad de esta enzima, y por tanto senescencia celular, adquiere un color azul detectable al microscopio de campo claro. Realizamos este ensayo sobre secciones de médula, acompañado de tinción nuclear con Fast-Red, observando que efectivamente, la actividad de la SA- β -galactosidasa es mayor en los ratones sin Ezh1 que en los controles, lo que indica una mayor senescencia en ausencia de la histona-metiltransferasa (Fig. 15A). En segundo lugar, para confirmar este resultado obtenido en médula completa, y enfocararlo en poblaciones más específicamente caracterizadas de HSC, analizamos también la actividad de la β -galactosidasa mediante citometría de flujo (FACSGal). Para la reacción utilizamos C₁₂FDG, un análogo permeable del FDG (fluoresceinin di-galactosidasa) que entra en las células de forma pasiva y actúa como sustrato para la β galactosidasa.

Cuando esta enzima lo procesa genera dos moléculas de FITC que son retenidas en el interior celular por una cola lipofílica. Esta técnica es compatible con el marcaje habitual con anticuerpos, por lo que tras la incubación con el sustrato, marcamos las células para analizar el nivel de actividad senescente en las LSK y cada una de sus subpoblaciones (LT-HSC, ST-HSC y MPP). Los datos que obtuvimos mediante citometría, demuestran que el papel protector que parece desempeñar Ezh1 frente a la senescencia celular, es más importante en las poblaciones menos diferenciadas. Encontramos por tanto la mayor diferencia entre Ezh1-KO y Control en las LT-HSC, seguida de las ST-HSC y finalmente los MPP, siendo la actividad senescente en los tres casos mayor en las células Ezh1-KO que en las controles (Fig. 15B).

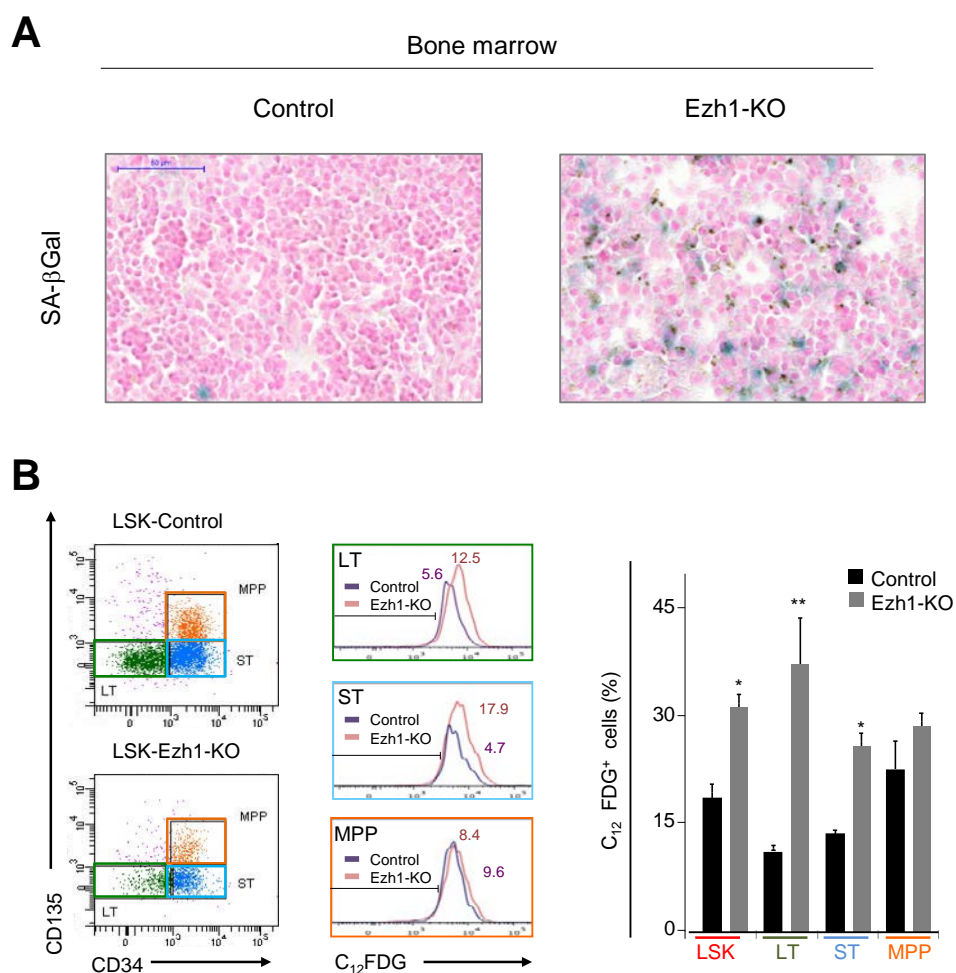


Figura 15: Análisis de la actividad de la βgalactosidasa asociada a senescencia

A) Tinción ex vivo sobre células de médula total en animales control y Ezh1-KO a pH 6, que reflejan en azul las células que presentan actividad de la βgalactosidasa asociada a la senescencia.

B) Los histogramas muestran la mediana de la intensidad de fluorescencia en las subpoblaciones de LSK. Los gráficos muestran el porcentaje de células positivas para la actividad de la βgalactosidasa asociada a senescencia, determinada por citometría en LSK, LT, ST, y MPP de animales Control y Ezh1-KO.

7. Regulación génica por Ezh1

Para elucidar los mecanismos de acción por los cuales la delección de Ezh1 dificulta la normal función de las HSC, hemos realizado un análisis de expresión génica de células LSK procedentes de médula ósea de animales Ezh1-KO y Control aisladas mediante citometría de flujo. Un riguroso análisis de la colección de genes identificó que 778 de ellos se encontraban diferencialmente regulados entre genotipos, siendo 297 los que mostraban menos expresión ante la ausencia de Ezh1 y 491 los que aparecían sobreexpresados en el Ezh1-KO frente al Control (Fig 16B). La lista completa de dichos genes se depositó en la base “[Gene Expression Omnibus](#)” con el número de acceso [GSE36288](#), y fue objetivamente clasificada mediante el análisis de “*Gene Ontology*”. De acuerdo con esta clasificación, encontramos diferencias en varios grupos de genes según su función (Fig 16A). Entre aquellos que presentaban unos menores niveles de expresión en las células Ezh1-KO con respecto a las control, se encontraban genes cruciales para la función de las HSC, como Gata3, Runx1, Meis1, Myb, Pten, Foxo3a, Thy1.1, Abcg2, Srgap2, Pbx1 y Cdkn1a (Chambers et al., 2007a; Forsberg et al., 2010). De la misma forma se vieron afectados factores esenciales para la diferenciación linfoide (Ng et al. 2009; Oguro et al 2010) como Dntt, Flk2, Igh6, Ikaros, Sfpi1 y Mef2c, o relacionados con el ciclo celular como Cdc6, Cdk1 y Mcm5, sugiriendo una detención del crecimiento (Kuilman et al., 2010). El conjunto de genes que presentaba una menor expresión en las células control que en las Ezh1-KO estaban relacionados procesos de diferenciación/desarrollo. Además, en las HSC Ezh1-KO detectamos una fuerte sobreexpresión de genes codificantes del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) con respecto al control (Coppé et al., 2010). Ejemplos de ello son IL-6, IL7, GM-CSF y algunas proteínas de unión a factores de crecimiento de tipo insulínico (ej. Bmp2, Igfbp1) (Fig 16C). Estos datos sugieren que Ezh1 actúa reprimiendo la secreción de tales factores clave para la senescencia. Asimismo hemos detectado una expresión alterada en genes regulados por otros miembros de Polycomb, existiendo genes que se expresaban de manera superior en el Ezh1-KO frente al control como Dkk2, Cyp1b1, Vsnl1 o IL6R, y otros en los que su nivel de expresión era menor en ausencia de Ezh1 como H2Afx, Gmnn o Foxc1 (Fig 16C) (Bracken et al., 2006; Majewski et al., 2008).

Para varios genes de cada uno de los grupos incluidos en la clasificación de *Gene Ontology* (Fig 16A), los cambios de expresión fueron validados por RT-PCR, confirmando así los datos obtenidos en los análisis (Fig 17).

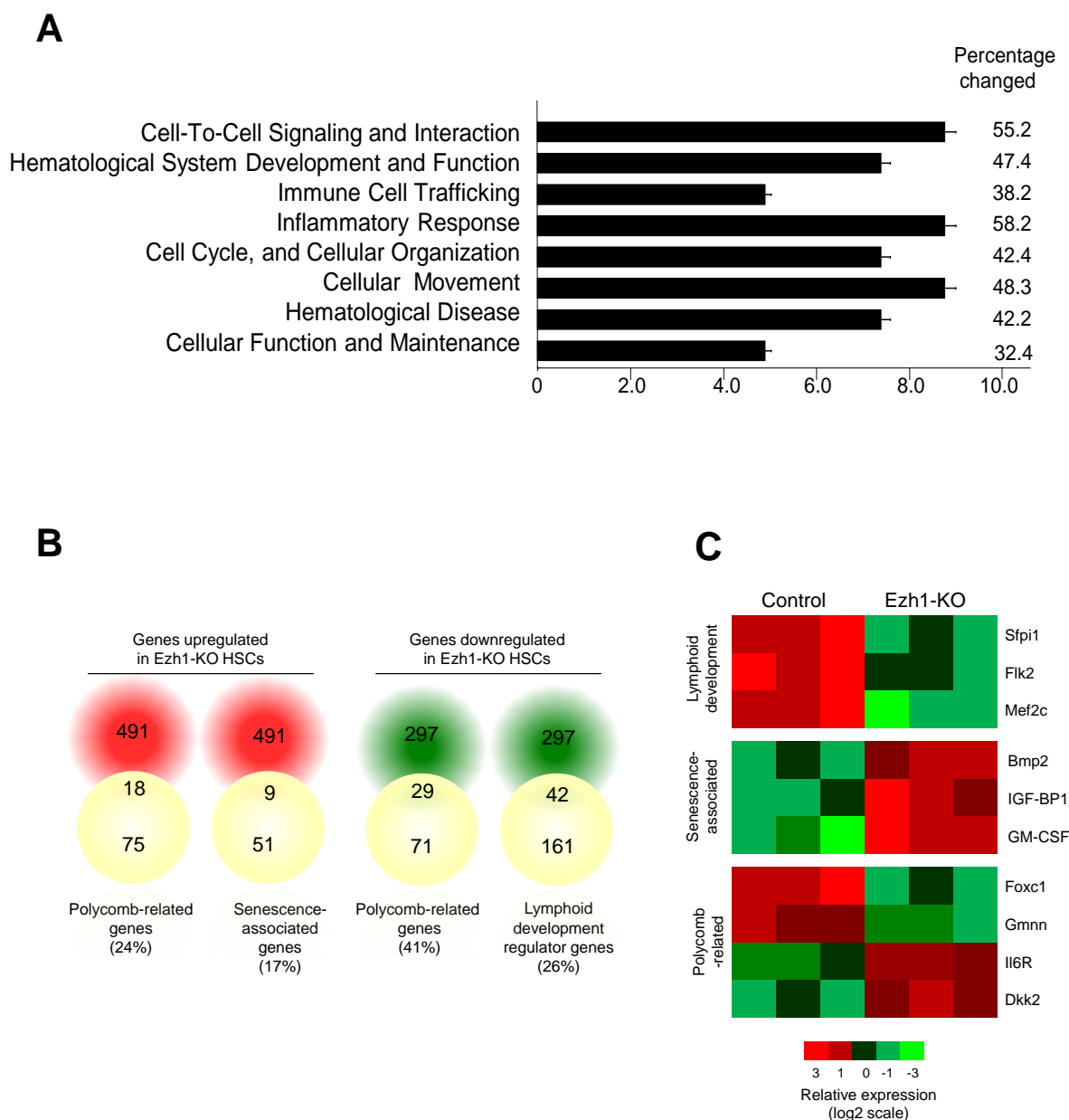


Figura 16: Análisis de expresión génica en HSC control y Ezh1-KO.

A) Clasificación de las funciones principales según *Gene Ontology* de los genes que se encuentran diferencialmente expresados entre genotipos.

B) Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de los grupos de genes tanto sobreexpresados como reprimidos en las HSC Ezh1-KO frente al control con los conjuntos de genes establecidos en base a sus funciones.

C) Expresión relativa detallada de las HSC Ezh1-KO con respecto a las HSC control de los principales genes incluidos en cada subgrupo previamente descrito en el diagrama de Venn.

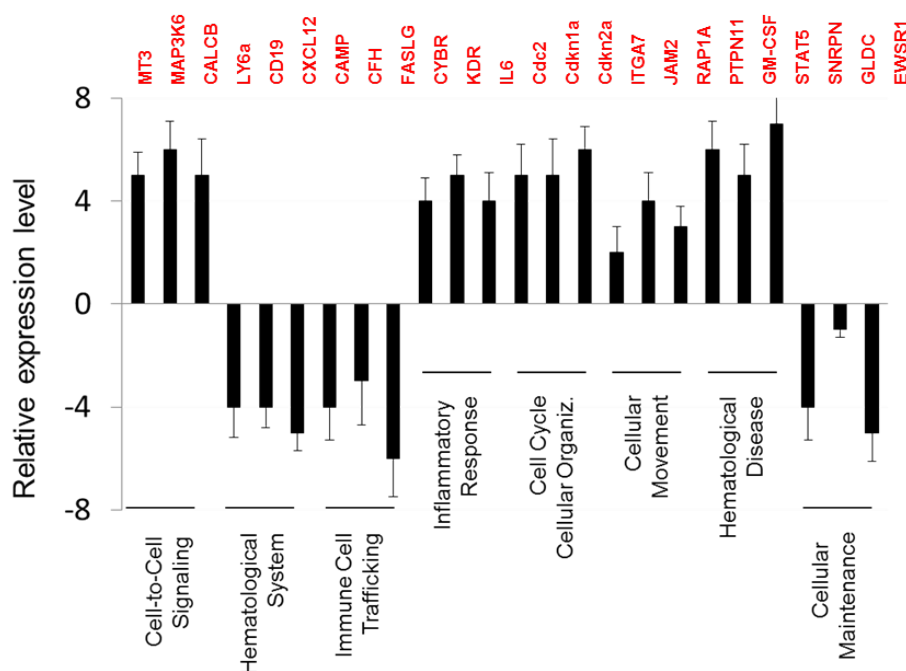
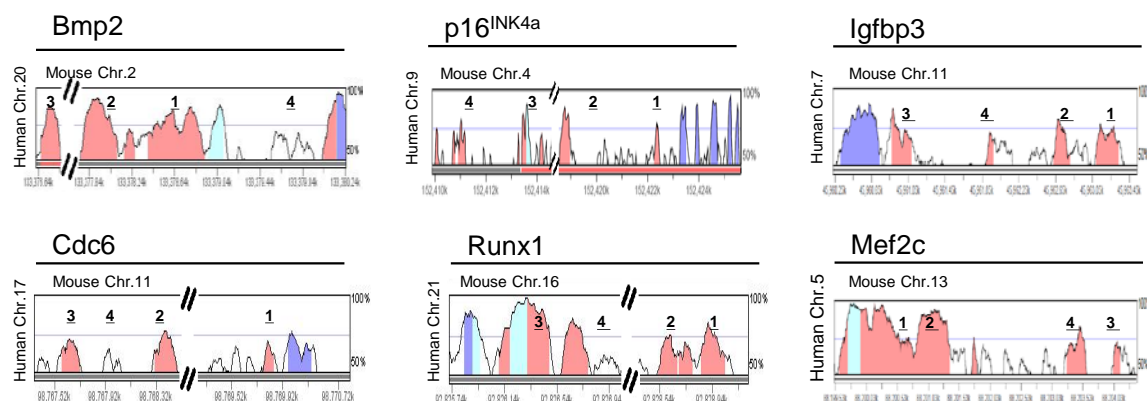


Figura 17: Validación de los análisis de expresión génica en HSC Ezh1-KO y controles

Niveles de expresión relativa de algunos genes de cada categoría de la clasificación GO medidos por RT-PCR en HSC sorteadas. Se muestran las medias \pm SD de tres réplicas en HSC Ezh1-KO normalizado frente al control

El siguiente paso fue realizar experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina en HSC aisladas (LSK), para detectar el efecto de la delección de Ezh1 sobre su principal marca epigenética: la metilación de la H3K27. La mono-, di- y trimetilación de esta histona fueron evaluadas en las regiones promotoras de algunos de los genes diana de Ezh1 previamente identificados en los análisis de expresión (Fig. 18A). Con este experimento se observó que la falta de Ezh1 generaba una mayor cantidad de tanto de H3K27me como de H3K27me2 en las regiones promotoras de aquellos genes que se encontraban reprimidos en los ratones Ezh1-KO con respecto a los controles, como Cdc6, Runx1 o Mef2c. En contraposición, las señales represoras H3K27me y H3K27me2 eran prácticamente ausentes en los promotores de p16INK4a, Bmp2 o Igfbp3, genes que se encontraban sobreexpresados en los modelos Ezh1-KO frente a los controles. Al analizar la H3K27me3 en las regiones promotoras de estos genes, presentaban un nivel significativamente menor las HSC Ezh1-KO que los controles, mientras que para los genes reprimidos sin embargo, no se encontraron diferencias entre ambos genotipos. Estos resultados indican que la represión dependiente de Ezh1 induce la H3K27me como producto primario de la reacción del complejo PRC2-Ezh1, con la consiguiente H3K27me2, constituyendo así el sustrato para la H3K27me3 ejercida principalmente por el PRC2-Ezh2 (Fig 18B).

A



B

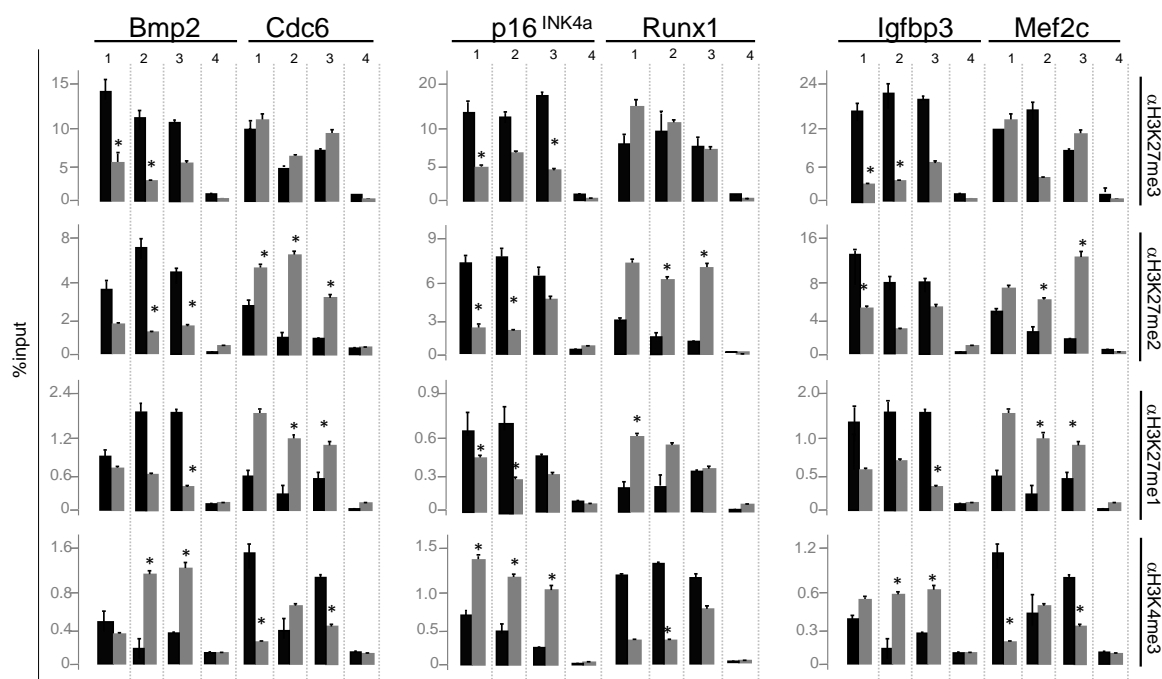


Figura 18: Análisis de las principales marcas epigenéticas en los genes diferencialmente regulados para células LSK Ezh1-KO y controles.

A) Diagrama ilustrativo del contexto genómico de las regiones promotoras de Bmp2, Cdc6, p16^{INK4a}, Runx1, Igfbp3 y Mef2c. El eje X muestra el porcentaje calculado de homología entre las secuencias humana y murina sobre una ventana de 200 nucleótidos en cada pareja de bases (el azul oscuro indica la región codificante y el azul claro la región 5' UTR). Las secuencias fueron comparadas con VISTA para incluir una mayor porción de cada región promotora.

B) Análisis del experimento de ChIP para las regiones promotoras de las células LSK Ezh1-KO y Control. El ADN unido a la cromatina fue sondado con anticuerpos para H3K27me3, H3K27me2, H3K27me1 y H3K4me3. IgG fue usado como control. Los porcentajes de ADN se muestran como las medias \pm SD de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$).

8. Reversión del fenotipo senescente de las HSC Ezh1-KO por represión del locus Cdkn2a.

Los datos obtenidos en los análisis de expresión génica nos muestran un significativo incremento del locus Cdkn2a en las HSC Ezh1-KO con respecto a los controles (Fig. 17). Este locus codifica a Arf y a p16^{INK4}, gen claramente relacionado con procesos senescentes como los hallados en nuestras HSC Ezh1-KO. Por lo que hipotetizamos que el incremento de la senescencia celular en las HSC tras la delección de Ezh1 es debida a la consecuente pérdida de represión sobre Cdkn2a.

Para abordar debidamente esta hipótesis, generamos un modelo de ratón triple knock-out condicional: Ezh1^{f/f}, p16^{INK4af/f}-Arf^{f/f}, vavCre^{tg/+}, (en adelante, TKO), y su control respectivo Ezh1^{f/f}, p16^{INK4af/f}Arf^{f/f}, vavCre^{+/+}, (en adelante, Control-TKO). Con esta herramienta delecionamos condicionalmente p16^{INK4a} y Arf en sistema hematopoyético primitivo sobre un fondo nulo para Ezh1.

En primer lugar comprobamos mediante RT-PCR que existía una absoluta delección de Ezh1, p16 y Arf (Fig. 19) en los animales TKO frente a los controles. También detectamos cierta alteración en la expresión en HSC de los previamente establecidos como genes diana de Ezh1: Runx1 o Cdc6, que en este caso muestran una importante sobreexpresión en los TKO en comparación con los controles (Fig. 19), al contrario de lo que ocurría en los animales Ezh1-KO. Por otro lado nos cercioramos de que esta delección no estaba acompañada de un mecanismo compensatorio según el cual incrementarían los niveles de expresión de otros genes de Polycomb (datos no mostrados).

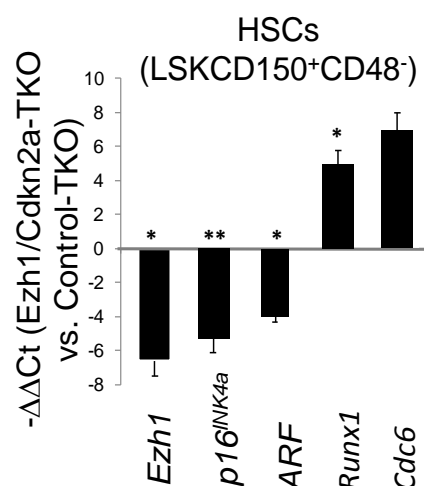


Figura 19: Análisis de la expresión génica en las LSK- TKO y control.

Análisis por RT-PCR de la expresión de Ezh1, Ezh2, p16^{INK4a}, ARF, Runx1 y Cdc6. Se muestra el -ΔΔCt de las HSC-SLAM del ratón TKO en relación al del Control. Los resultados fueron normalizados con los niveles de β-actina (medias ±SD, n=12, **p<0,001, p<0,05).

Al analizar estos animales, hemos comprobado que el número total de células para MO, timo y bazo, era similar entre los ratones TKO y sus respectivos controles. Asimismo, ambos animales presentaban las mismas proporciones de las principales poblaciones en médula, incluyendo LSK, CLP y MP (Fig. 20).

A

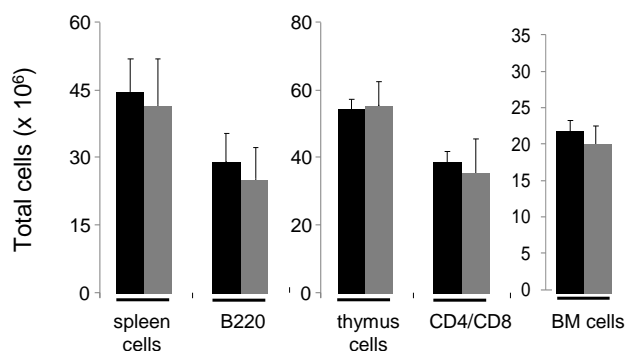
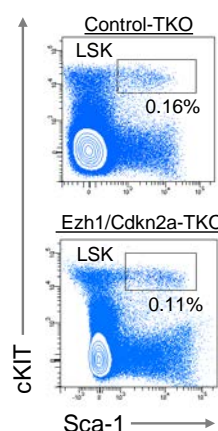


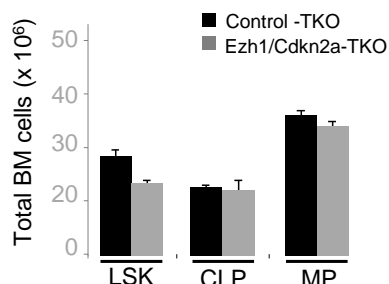
Figura 20: Principales poblaciones de progenitores hematopoyéticos en médula de animales TKO y controles.

A) Número total de linfocitos maduros B220 y CD4/CD8 y números absolutos de células para los órganos timo, bazo y médula. Los gráficos representan la media \pm SD (n=5).

B



C



B) Panel representativo de análisis citométrico de médula ósea donde se indica la media del porcentaje de células LSK para los animales TKO y sus controles (n=5).

C) Números absolutos por fémur de las subpoblaciones LSK, CLP y MP en médula de los animales TKO y controles. Los datos muestran la media \pm SD (n=8).

También analizamos la senescencia de las HSC mediante citometría de flujo y detectamos que la ausencia del locus Cdkn2a condujo a una mayoritaria recuperación de la senescencia causada por la deficiencia de Ezh1 (Fig. 21), siendo prácticamente igual la señal de SA- β galactosidasa en las células LSK de animales TKO como en las de sus controles.

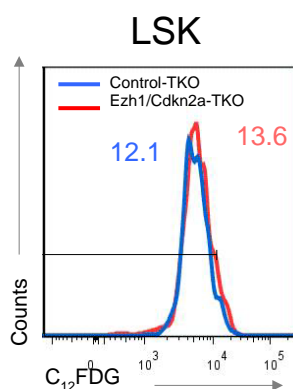


Figura 21: Actividad SA- β -galactosidasa de las LSK-TKO y controles.

Los gráficos muestran la mediana de la intensidad de fluorescencia asociada a la actividad de la β galactosidasa en las LSK de los distintos genotipos. Se representa la media \pm SD (n = 6, *p < 0.05, **p < 0.001).

Por último, chequeamos la funcionalidad de las HSC TKO y control mediante experimentos de trasplante competitivo para analizar su capacidad de repoblación. Encontramos que 8 semanas post-trasplante, en sangre periférica, sólo bajaba levemente la contribución del donante TKO con respecto a los controles a la población de linfocitos de manera no significativa, sin generar prácticamente ningún efecto en las células mieloides (Fig. 22) ni en ningún otro órgano hematopoyético (datos no mostrados). Estos resultados indican que la eliminación de Cdkn2a en un contexto sin Ezh1, restaura mayoritariamente la hematopoyesis y evita la senescencia de las HSC sin Ezh1.

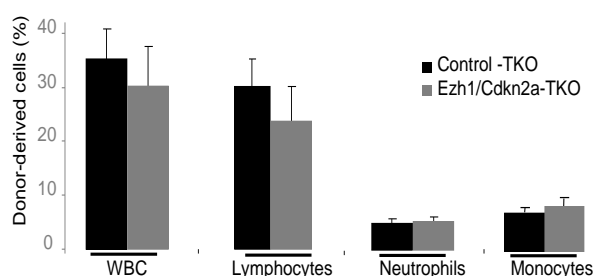


Figura 22: Sangre periférica de animales trasplantados con HSC TKO y controles.

Contribución de las células derivadas de la médula donante (CD45.2) de los TKO y Control a las poblaciones de sangre periférica en los recipientes 4 semanas después del trasplante. Los datos son la \pm SD (n = 7).

9. Caracterización fenotípica de la hematopoyesis madura en animales Ezh1-KO y controles

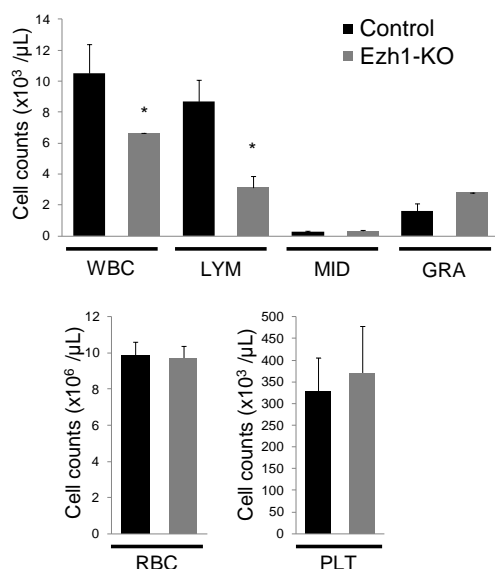


Figura 23: Análisis sangre periférica en animales Ezh1-KO y Controles.

Contajes hematológicos absolutos en sangre periférica de animales Ezh1-KO y controles de entre 20 y 22 semanas de edad. Se muestran medias \pm SD para n = 7. (*p<0,05)

Dadas las diferencias tanto cuantitativas como funcionales detectadas en las HSC de los animales Ezh1-KO con respecto a sus controles, decidimos analizar si la delección de este gen afecta también a la hematopoyesis adulta *in vivo*, con lo que se analizaron en ratones adultos Ezh1-KO y controles sangre periférica, timo y bazo.

En primer lugar analizamos la sangre periférica de los animales Ezh1-KO y control, y tanto los contajes hematológicos como los análisis por citometría de flujo revelaron la existencia de cierta disminución en el número total de células blancas sanguíneas por volumen en los ratones sin Ezh1 frente a sus controles,

atribuyéndose esta disminución a la fracción linfoide (Fig.23), y más específicamente a los linfocitos B (datos no mostrados). No existen diferencias en las poblaciones mieloides ni se observó ningún efecto en los números totales de eritrocitos o plaquetas (Fig.23).

A la hora de analizar el timo, tampoco se observaron diferencias significativas en la frecuencia ni en el número absoluto de linfocitos T entre los animales Ezh1-KO y controles, que fueron analizados por citometría de flujo en base al marcaje con los anticuerpos CD4 y CD8, así como no existían diferencias macroscópicas en cuanto al tamaño de los timos Ezh1-KO y control (Fig 24A).

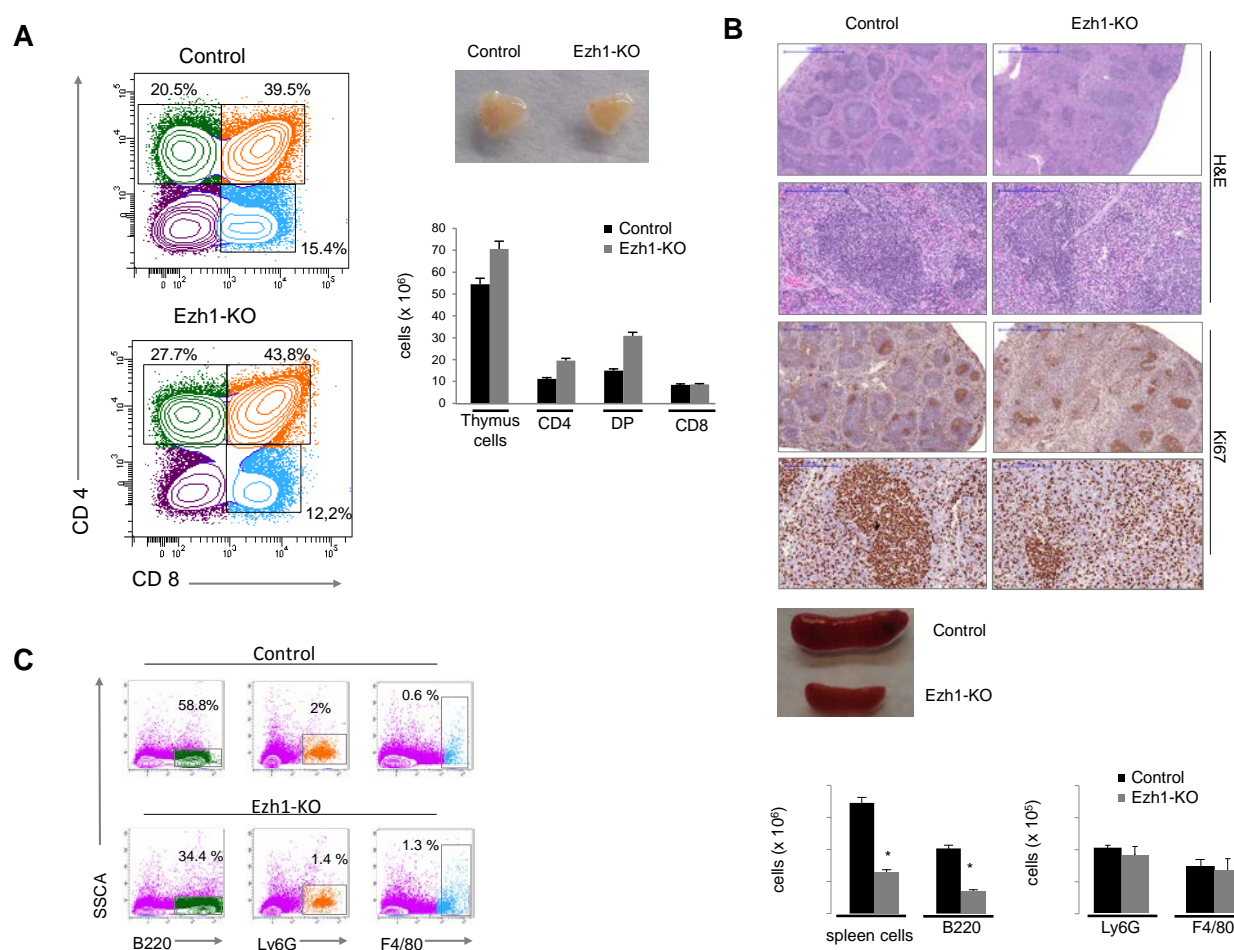


Figura 24: Caracterización de timo y bazo para los animales Ezh1-KO y controles.

A) Paneles representativos del análisis citométrico del timo de animales adultos en el que se muestran las poblaciones de linfocitos CD4, CD8 y doble positivos tanto en animales control como Ezh1-KO. Las barras muestran la media \pm SD de los números absolutos para una n=10. La fotografía muestra el tamaño del timo de un animal Control y Ezh1-KO.

B) Fotografía que muestra la diferencia de tamaño entre los bazos de los animales Control y Ezh1-KO. Tinciones de H&E para ver morfología de bazo y de Ki67 para ver proliferación.

C) Paneles representativos del análisis citométrico del bazo de animales adultos en el que se muestran las poblaciones de linfocitos B (B220⁺) granulocitos (Ly6G) y macrófagos (F4/80), tanto en animales control como Ezh1-KO. Las barras muestran la media \pm SD de los números absolutos para una n=10.

Al analizar el bazo de estos animales, observamos que su tamaño en los controles era significativamente mayor a los de los Ezh1-KO (Fig. 24B). Realizamos tinciones inmunohistoquímicas para el marcador Ki67, según las cuales las células de los bazos Ezh1-KO proliferaban menos que en los controles. También se realizaron tinciones de H&E que revelaron una importante hipoplasia en las pulpas rojas y blancas así como la ausencia de centros germinales en los bazos Ezh1-KO con respecto a los controles (Fig. 24B). Dichos centros son las zonas de maduración de linfocitos B en el bazo, con lo cual, nuestro análisis histológico se correlaciona con la deficiencia de células B maduras que detectamos más tarde en la caracterización citométrica de estos órganos, sin encontrar diferencias significativas en las poblaciones mieloides de macrófagos o granulocitos (Fig. 24C). Tras la obtención de este dato, decidimos profundizar más en cuanto a la población de linfocitos B, analizando su maduración en médula ósea mediante la caracterización citométrica en base a su expresión de IgM, B220 y CD43. Con este experimento pudimos ver que existía un alterado desarrollo de las células pro-B, pre-B e inmaduras, con la consecuente reducción total de linfocitos B maduros recirculantes (Fig. 25) en los animales Ezh1-KO con respecto a los controles, mostrando un defecto similar al encontrado en los animales deficientes en sistema hematopoyético de su proteína homóloga Ezh2 (Su et al., 2012). Éstos resultados sugieren que Ezh1 es necesario en la adecuada diferenciación de las HSC hacia el linaje linfoide.

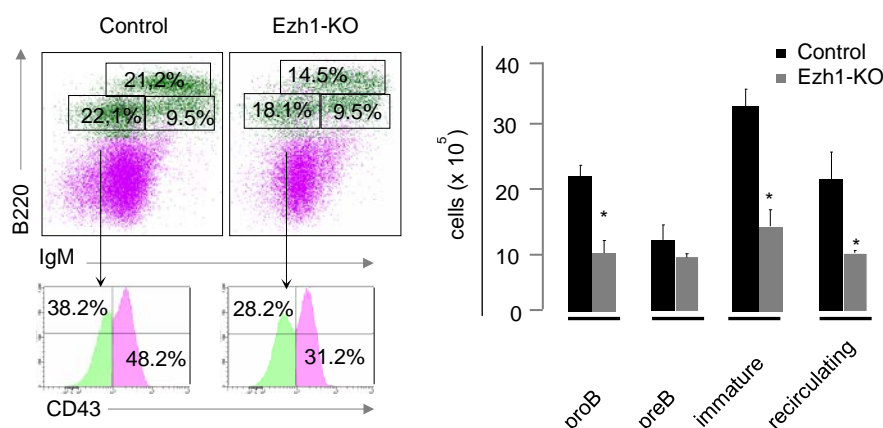


Figura 25: Análisis de maduración en médula ósea de linfocitos B Ezh1-KO y controles.

Análisis de los distintos estadios de maduración de los linfocitos B en médula ósea de animales KO-Ezh1 y Control, en base a su expresión de B220, IgM y CD43. Los gráficos representan el total de células por fémur, mostrando media \pm SD para una n=12 ($p^*=0,05$).

Capítulo 2: Regulación de las células madre hematopoyéticas y su nicho mediante el gen *Bmi1*.

1. Principales fuentes de *Bmi1* en la médula ósea

Para investigar el papel de *Bmi1* como potencial regulador del nicho de las HSC, nuestra primera aproximación fue determinar su expresión en las poblaciones mayoritarias que lo componen. Para ello y con el fin de delimitar nuestras poblaciones de interés utilizamos varios modelos de ratón. En primer lugar, usamos un modelo *Cxcl12^{GFP}*, en el que en un alelo de *CXCL12* se ha reemplazado su exón 2 por la secuencia del reportero GFP (Ara T. et al., 2003). Este modelo nos va a permitir identificar en médula a las células CAR, importantes componentes del nicho hematopoyético. Igualmente dispusimos de dos modelos con el sistema cre-recombinasa bajo distintos promotores: *VavCre* para las HSC (Georgiades et al., 2000; de Boer et al., 2003) y *NesCre^{ERT}* para las MSC que expresan Nestin (Burnst et al., 2007). Estos dos ratones fueron cruzados con un modelo que presenta el cDNA del gen reportero *katushka fluorescent protein* (KFP) (Dieguez-Hortega et al., 2011) precedido por un *cassette* STOP flanqueado por secuencias loxP. Una vez establecidos los tres modelos, analizamos por citometría de flujo el porcentaje de KFP o GFP que existía para cada uno de ellos en sendas poblaciones en médula ósea.

Para analizar las poblaciones de interés utilizamos una combinación de anticuerpos previamente detallada (ver sección Materiales y Métodos) que contiene los marcadores CD45, Ter119, CD31, Sca1 y CD51. Este panel nos permite identificar a los subconjuntos de células madre mesenquimales (CD45-, Ter119-, CD31-, Sca1+ y CD51+), células endoteliales (CD45-, Ter119-, CD31+ Sca1+) y osteoblastos (CD45-, Ter119-, CD31-, Sca1- CD51+) (Ding L. et al., 2013; Schepers K. et al., 2013; Winkler IG. et al., 2010).

Nuestros primeros resultados indicaron que un 53% de las MSC en los animales *Cxcl12^{GFP}* mostraban *GFP^{hi}* frente al 12% de los osteoblastos. En el modelo *Vav-Cre^{tg/+}KFP^{tg/+}*, se expresaba KFP aproximadamente en un 93% de las HSC y en el 5,5% de las EC. Y finalmente, tras inducción con tamoxifeno en el caso del sistema *NestinCreER^{tg/+}KFP^{tg/+}*, vimos que un 13% de las MSC expresaban KFP mientras que los osteoblastos lo hacían en un 4,7% (Fig 26 A-C).

Adicionalmente, se aislaron las poblaciones *Cxcl12-GFP^{hi}* del primer modelo, *LSK-KFP+* del segundo y *MSC-KFP+* del tercero y se midieron los niveles de mRNA

para *Bmi1* por RT-PCR. Este experimento mostró que el mayor reservorio de *Bmi1* en médula ósea es la población de HSC, seguida por las células CAR y finalmente las MSC-Nes+, siendo las tres importantes fuentes de *Bmi1* en comparación al total de células de médula (Fig. 26D).

Posteriormente, para comprobar que las células que estábamos seleccionando como MSC cumplían las características que definen a esta población, analizamos su expresión para el *platelet derived growth factor receptor α* (PDGF α) (Pinho et al., 2013), así como su capacidad para formar colonias (CFU). Estos análisis se realizaron en comparación a la población de osteoblastos, y detectamos que un 93% de MSC se mostraba positivo para el marcador PDGFR α frente al 20% de los OBC (Fig 27A). Además, las MSC presentaban una mayor capacidad formadora de colonias con respecto a los OBC (Fig 27B). Asimismo, células obtenidas de las colonias procedentes de las MSC, al ser incubadas con medios de diferenciación tanto adipogénico como osteogénico, generaron en su mayoría adipocitos y osteoblastos, mientras que la fracción de OBC, sólo generó adipocitos esporádicos (Fig. 27C).

2. Papel regulador de *Bmi1* en los subtipos celulares del nicho hematopoyético.

Ante la evidencia observada de que *Bmi1* está presente tanto en las poblaciones de HSC y de MSC-Nes+, nos dispusimos a analizar el efecto que puede tener su eliminación en cada una de ellas. Para ello, utilizaremos un ratón knock-out condicional previamente generado en nuestro laboratorio (Arranz L. et al., 2012). Este ratón junto a los dos modelos previamente descritos (VavCre y Nes^{ERT}Cre), nos permitirá eliminar nuestro gen para evaluar los efectos de su carencia tanto en HSC como en MSC-Nes+.

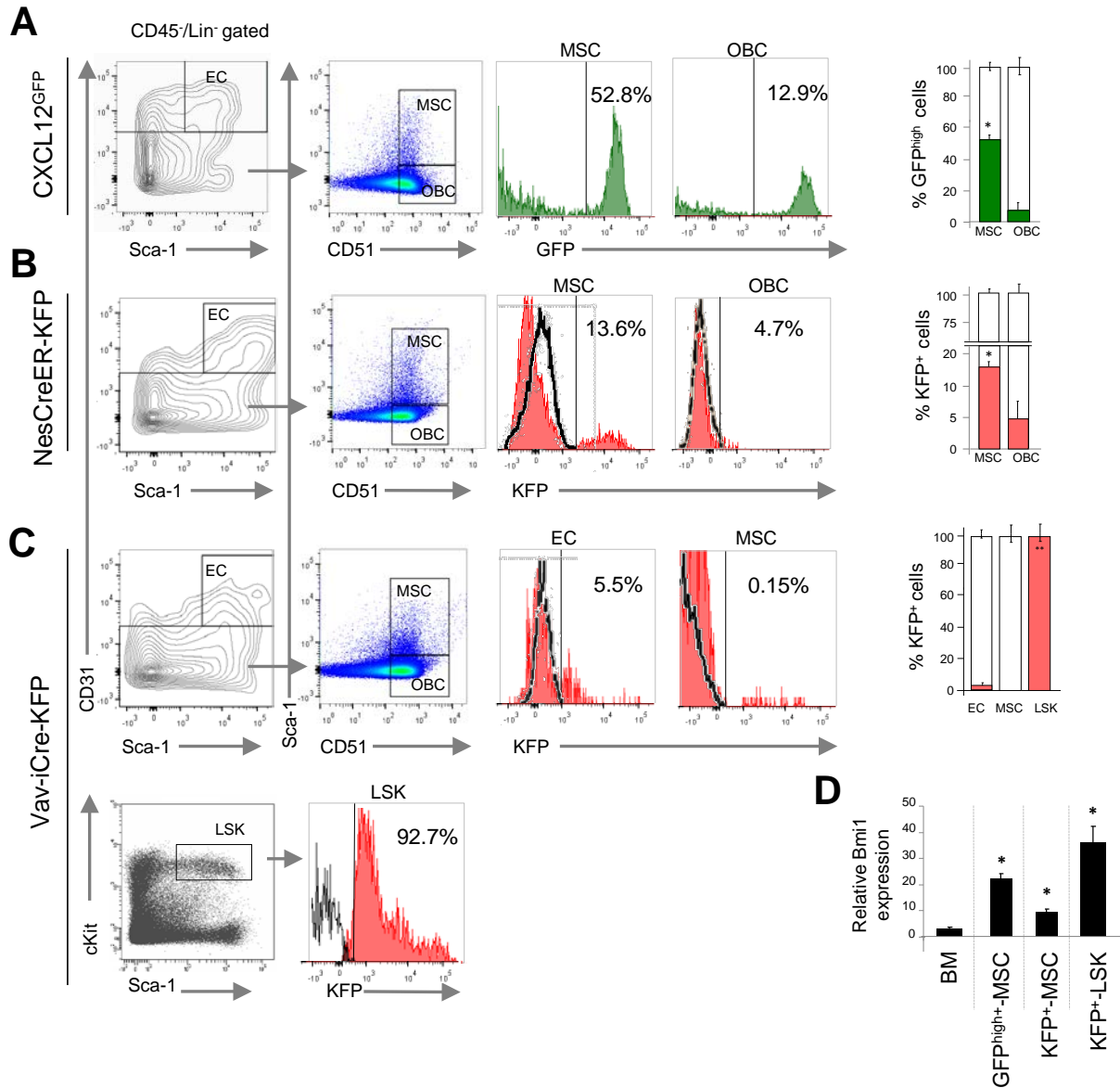


Figura 26: Expresión de *Bmi1* de manera wt en las distintas poblaciones del nicho hematopoyético

A-C) Izquierda: Paneles representativos del análisis por FACS que muestran las poblaciones MSC, OBC (A-B) y EC, MSC y HSC (C) y sus frecuencias en función de los marcadores específicos para cada una de ellas de los animales Cxcl12^{GFP}; NesCre^{ERT}-KFP y VavcreKFP. En los histogramas se muestra el porcentaje medio de células positivas para GFP y KFP en cada caso. Los histogramas negros indican el nivel de fluorescencia de KFP en las poblaciones control. Al menos cinco animales por genotipo fueron analizados en dos experimentos independientes. Las barras a la derecha indican el porcentaje de células KFP o GFP positivas para cada población. Se muestra la media \pm SD (n=10 *p<0,05).

D) Niveles de expresión de *Bmi1* medidos por RT-PCR en las distintas poblaciones de médula aisladas por citometría de flujo así como de la médula total. Se han aislado las células GFP⁺-MSCs de los ratones Cxcl12^{GFP}, KFP⁺-MSCs de Nestin-CreER-KFP, y KFP⁺-LSKs de los Vav-iCre-KFP. Los resultados están normalizados frente a β -actina y expresados como el *fold-change* de cada población indicada con respecto a la médula total. Se muestran las medias \pm SD (n=12, * p<0.05)

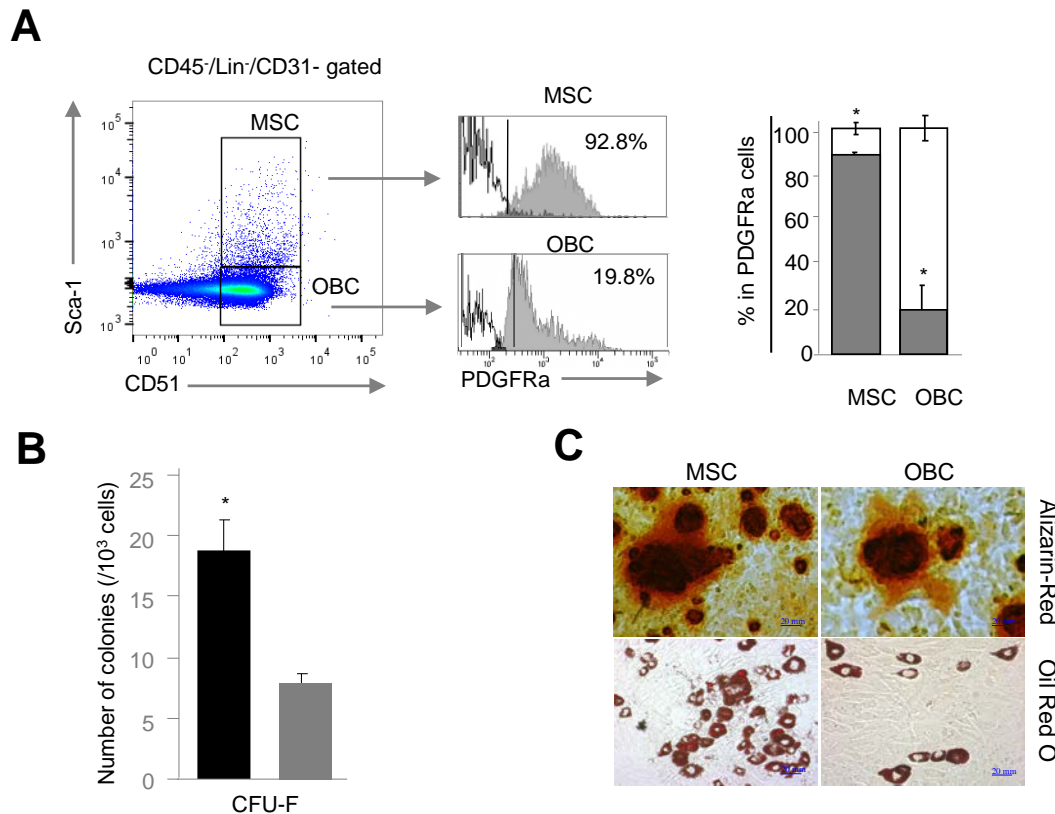


Figura 27: Características de las MSC seleccionadas en animales wt.

A) Izqda: Paneles representativos de la expresión del marcador PDGFRα analizado por FACS, en las poblaciones MSC y OBC. Dcha: Porcentaje de células positivas para PDGFRα en las poblaciones MSC y OBC. Las gráficas muestran medias \pm SD (n=9, *p < 0.05).

B) Capacidad clonogénica de las células seleccionadas como MSC y OBC mediante recuento de CFUs en ensayos de formación de colonias in vitro. Las gráficas muestran medias \pm SD (n=9, *p < 0.05).

C) Diferenciación de las células MSC y OBC a adipocitos y osteoblastos. Las barras representan 20μm.

2.1. Consecuencias en el nicho hematopoyético cuando la ausencia de Bmi1 produce una disminución de las HSC.

La utilización del sistema Vavcre para suprimir Bmi1 de las HSC (Arranz L. et al., 2012) genera un importante descenso de la totalidad de estas células en médula ósea, con lo que utilizaremos este modelo (Bmi1^{f/f}Vavcre^{tg/+}, de aquí en adelante Bmi1-KO-Vav) para evaluar el efecto de la carencia de dichas células en el resto del nicho hematopoyético.

En primer lugar se comprobó que la acusada pérdida de células LSK-SLAM procedentes de médula en el Bmi1-KO-Vav, generó una considerable disminución en la totalidad de las MSC, no así en los controles. Mientras tanto, el conjunto de células endoteliales era ligeramente menor en nuestro Bmi1-KO-Vav que en su control aunque

de manera no significativa, y la fracción de OBC permanecía sin cambios tanto en los Bmi1-KO-Vav como en los controles (Fig. 28).

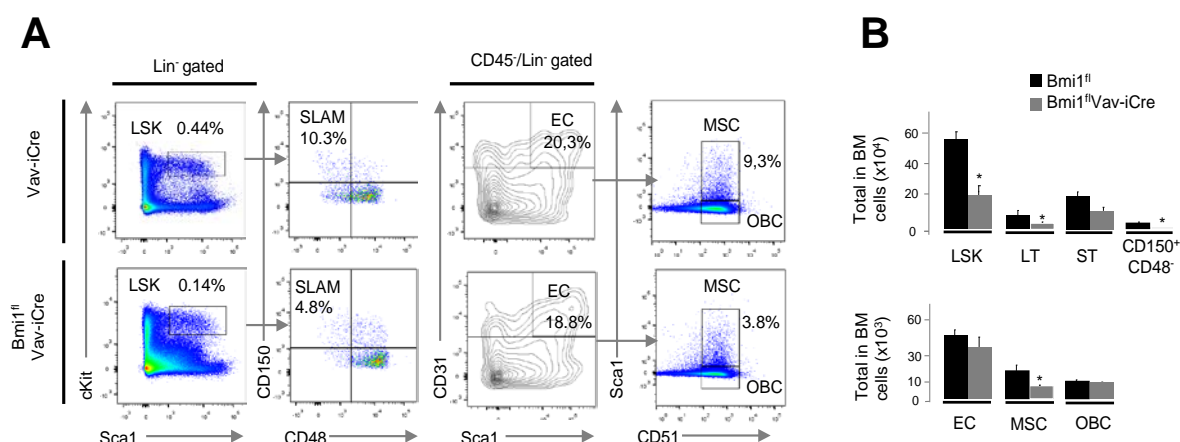


Figura 28: Caracterización de las principales poblaciones del nicho hematopoyético en animales Bmi1-KO-Vav y sus controles.

A) Paneles representativos de los análisis por FACS de las poblaciones HSC y sus subpoblaciones, y de las MSC, EC y OBC en animales deficientes en Bmi1 en sistema hematopoyético. Los números indican los porcentajes del total de las células nucleadas de médula ósea.

B) Números absolutos por fémur de las poblaciones indicadas en los animales control y Bmi1-KO (medias \pm SD; n=12, *p<0,05).

Como ya anteriormente se había observado (Arranz L. et al., 2012), los ratones deficientes en Bmi1 mostraban histológicamente un incremento en el número de adipocitos presentes en médula frente a sus controles (Fig. 29A), lo que nos llevó a analizar la funcionalidad de las MSC de nuestros animales evaluando su capacidad de diferenciación adipogénica. Tras aislar las MSC de la médula de los Bmi1-KO-Vav y de sus controles, estas fueron cultivadas durante 20 días con medio de diferenciación adipogénico y se comprobó que efectivamente, las células procedentes del Bmi1-KO-Vav presentaban una mayor diferenciación hacia este tipo celular que las células del control. Este potencial adipogénico se evaluó mediante tinción con Oil Red O, compuesto que nos permite visualizar los lípidos neutros. También se llevó a cabo una diferenciación de MSC con medio de cultivo osteogénico, no existiendo diferencia alguna en cuanto a la capacidad para formar osteoblastos entre las MSC procedentes de Bmi1-KO-Vav y control. Este resultado se monitorizó gracias a la tinción con Alizarin Red S, que da una coloración naranja a los depósitos de calcio secretados por los osteoblastos (Fig. 29).

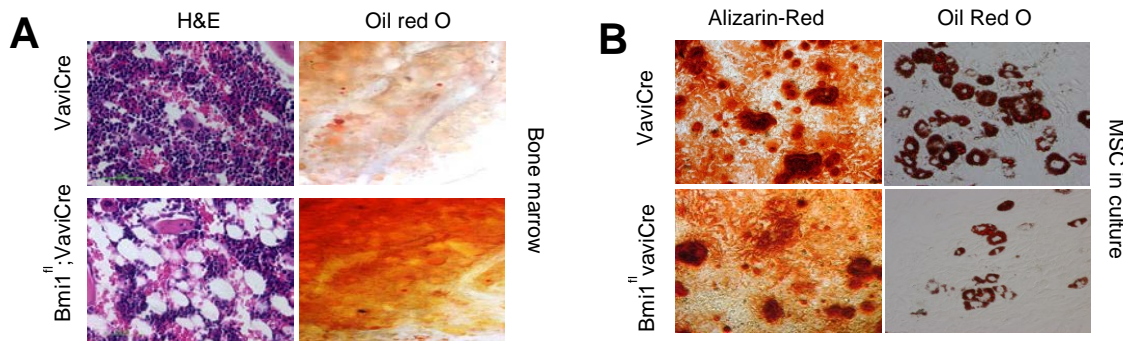


Figura 29: Diferenciación de las MSC en los modelos *Bmi1*-KO y control.

A) Tinciones de médula ósea en secciones femorales con H&E (izquierda) y Oil Red O (derecha), mostrando ambas un incremento de adipocitos en los animales carentes de *Bmi1* en las HSC.

B) Diferenciación in vitro de las MSC provenientes de los animales *KOBmi1-Vavcre*^{tg/+} y control a osteoblastos (izquierda) y adipocitos (derecha).

Para corroborar los resultados obtenidos en cuanto a cómo afecta la pérdida de *Bmi1* en HSC a las MSC, creamos nuevos modelos consistentes en cruzar nuestro *Bmi1*-KO-Vav con un *Cxcl12*^{GFP}, en los que se observó que también disminuía severamente el número de células CAR al tener lugar tanto la eliminación de *Bmi1* como la consecuente reducción del reservorio de HSC (Fig. 30).

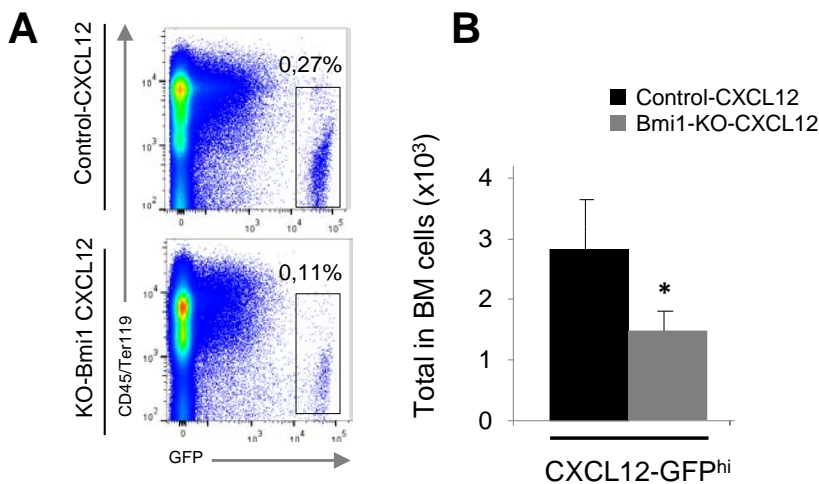


Fig. 30: Análisis de la población de células CAR en animales *Bmi1*-KO-CXCL12^{GFP} y sus controles.

A) Paneles representativos del análisis de las células CD45-/Ter119-/GFP^{hi} (CAR) de los animales *Bmi1*-KO-CXCL12^{GFP} y control-CXCL12^{GFP}. Los números indican la media del porcentaje frente al total de células de médula ósea para n=8.

B) Número total por fémur de células CXCL12^{GFP} en *Bmi1* KO-CXCL12^{GFP} y control-CXCL12^{GFP}. Las barras indican medias \pm SD (n=8 *p<0,05)

A fin de determinar la posible recuperación del fenotipo de estos animales mediante la presencia de Bmi1 en las HSC, se realizó un trasplante inverso en el que utilizamos los modelos Bmi1-KO-Vav-Cxcl12^{GFP} y Control-Cxcl12^{GFP} letalmente irradiados como recipientes. Como células donadoras se utilizó médula total de animales wt CD45.1. Pasadas ocho semanas se analizó la sangre periférica por citometría de flujo comprobando que las células trasplantadas contribuían a la recuperación de la MO tanto en los animales Control-Cxcl12^{GFP} como en los animales Bmi1-KO-Vav-Cxcl12^{GFP}, sin embargo, el análisis a las 16 semanas reveló una importante deficiencia en cuanto a la contribución de los progenitores hematopoyéticos en los recipientes Bmi1-KO-Vav-Cxcl12^{GFP} frente a los controles (Fig. 31).

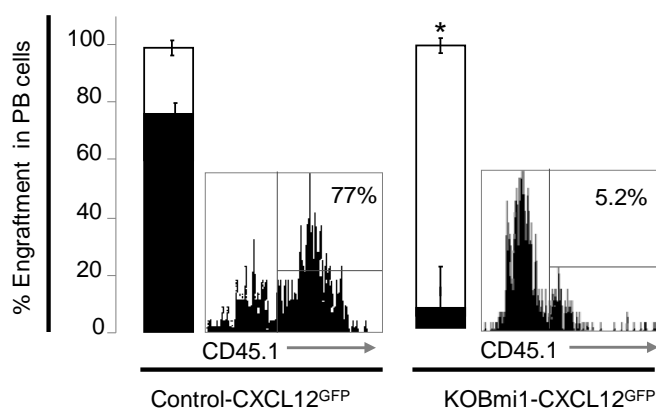


Figura 31: Análisis del trasplante inverso en ratones KO Bmi1-Cxcl12^{GFP} y sus controles.

Monitorización del quimerismo de los donantes cuatro meses después del trasplante inverso en cada tipo de ratón recipiente. Los histogramas corresponden a un experimento representativo. Las barras muestran medias \pm SD (n=9, *p<0,05).

Todos los resultados obtenidos con los animales Bmi1-KO y sus controles, así como en sus combinaciones con los animales CXCL12^{GFP} en su conjunto, sugieren que las HSC son específicamente requeridas para el mantenimiento y el correcto funcionamiento de las MSC.

2.2. Caracterización del nicho hematopoyético tras la eliminación del gen regulador Bmi1 en las MSC.

El subconjunto de células MSC que expresan Nestin en la médula ósea contribuyen de manera muy importante a la regulación de las HSC (Mendez-Ferrer et al., 2010). Por ello, queremos evaluar como la ausencia de Bmi1 en las MSC puede afectar a esta población y la influencia que las consecuencias de dicha eliminación pudiera ejercer sobre las HSC. Para tal fin, generamos un modelo Bmi1^{f/f}NestinCre^{ERT} (Bmi1-KO-Nes) en el que tras inducción con tamoxifeno, se activa

la enzima Cre-recombinasa en la población de MSC-Nes⁺, y por tanto eliminamos la expresión de Bmi1 de estas células. Al analizar estos animales y sus controles, en primer lugar observamos que el reservorio de las HSC primitivas era significativamente menor en los animales Bmi1-KO-Nes que en sus controles. También observamos un descenso en el número total de células de la médula y fracciones similares entre genotipos en cuanto a los compartimentos de EC así como de OBC, sin embargo, el conjunto de MSC estaba significativamente disminuido para los Bmi1-KO-Nes, al contrario que para los controles (Fig. 32).

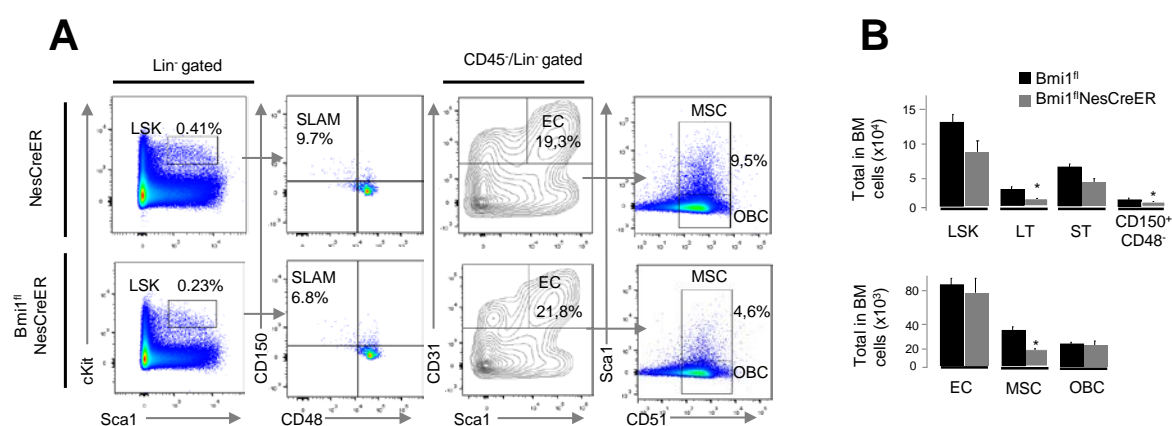


Figura 32: Caracterización de las principales poblaciones del nicho hematopoyético en animales KOBmi1-Nescre y Control.

A) Paneles representativos de los análisis por FACS de las poblaciones HSC y sus subpoblaciones, y de las MSC, EC y OBC en animales deficientes en Bmi1 en las células MSC-NES⁺. Los números indican los porcentajes del total de las células nucleadas de médula ósea.

B) Números absolutos por fémur de las poblaciones indicadas en los animales control y Bmi1-KO-NestinCre^{ERT} (medias \pm SD; n=12, *p<0,05).

Al igual que en el modelo anterior, detectamos que la reducción global de HSC en los animales esta vez de células MSC-Nes⁺, resultaba en un incremento del tejido adiposo dentro de la médula, comprobado en secciones histológicas por tinciones con hematoxilina y eosina así como con Oil red O (Fig 33A). Además, las células MSCNes⁺ fueron sorteadas de estos ratones y sus controles y testamos su capacidad de diferenciación a adipocitos y osteoblastos. Mientras que no presentaron diferencias en cuanto a su capacidad osteogénica, la diferenciación de las MSC a adipocitos se vio aumentada en ausencia de Bmi1, lo que sugiere que la delección de Bmi1 favorece la actividad mesenquimal de las MSC-Nes⁺ (Fig. 33B).

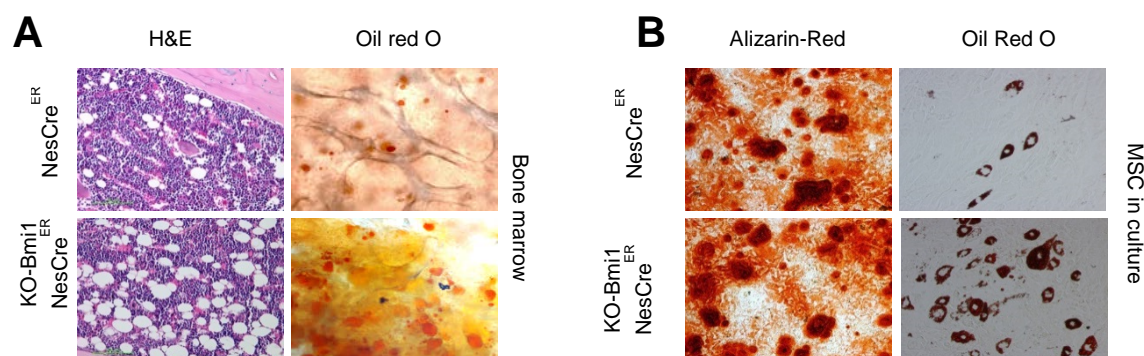


Figura 33: Diferenciación de las MSC en los modelos *Bmi1-KO-Nes* y control.

A) Tinciones de médula ósea en secciones femorales con H&E (izquierda) y Oil Red O (derecha), mostrando ambas un incremento de adipocitos en los animales carentes de *Bmi1* en las HSC.

B) Diferenciación in vitro de las MSC provenientes de los animales *Bmi1-KO-Nes* y control a osteoblastos (izquierda) y adipocitos (derecha).

Para evaluar cómo se ven afectadas otras poblaciones del nicho, hemos generado el modelo *Bmi1-KO-Nes-CXCL12^{GFP}*, que nos permite identificar el conjunto de las células CAR mediante su expresión de GFP, detectando una inminente disminución en dicha población (Fig. 34).

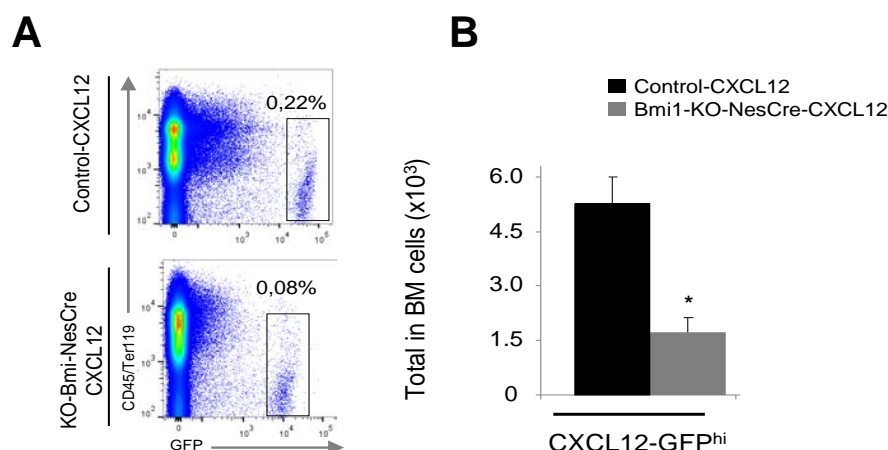


Figura 34: Análisis de la población de células CAR en animales *Bmi1-KO-Nes-CXCL12^{GFP}* y sus controles.

A) Paneles representativos del análisis de las células CD45-/Ter119-/GFP^{hi} (CAR) de los animales *Bmi1-KO-Nes-CXCL12^{GFP}* y control-CXCL12^{GFP}. Los números indican la media del porcentaje frente al total de células de médula ósea para n=8.

B) Número total por fémur de células CXCL12^{GFP} en *Bmi1-KO-Nes-CXCL12^{GFP}* y control-CXCL12^{GFP}. Las barras indican medias \pm SD (n=8 *p<0,05)

Dado que la expresión de Nestin se ha descrito en un amplio rango de células progenitoras, decidimos analizar la capacidad funcional de las HSC de estos animales en experimentos de trasplantes competitivos. Se utilizaron HSC de Bmi1-KO-Nes y de los controles (CD45.2) en la misma proporción que HSC wt procedentes de un animal idéntico al recipiente (CD45.1). Las HSC procedentes del donante Bmi1-KO-Nes, mostraron una capacidad dos veces más baja para repoblar la médula a largo plazo que los controles según el análisis de sangre periférica realizado doce semanas después del trasplante (Fig. 35).

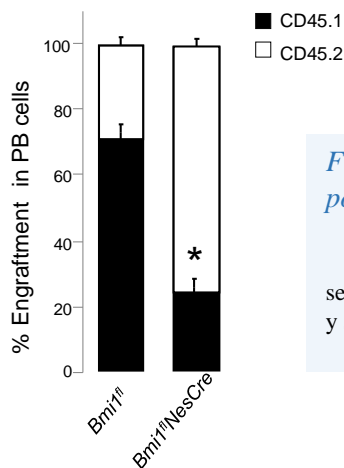


Figura 35: Análisis de la repoblación en sangre periférica por animales Bmi1-KO-Nes y controles.

Repoblación de las células donantes en ambos modelos recipientes según análisis de sangre periférica 4 semanas post-trasplante, para n=10 y siendo *p<0,05.

Adicionalmente, para analizar si la delección de Bmi1 en el nicho afecta directamente al proceso hematopoyético excluyendo algún efecto que pudiese haber en las HSC, utilizamos los ratones inducidos Bmi1-KO-Nes-Cxcl12^{GFP} como recipientes mientras que los donadores fueron ratones wt con fondo genético CD45.1. Al contrario que los controles irradiados y trasplantados, los hospedadores Bmi1-KO-Nes-Cxcl12^{GFP} presentaron un marcado descenso en la repoblación de su médula, tanto al analizar sangre periférica como el número total de células CAR (Fig. 36).

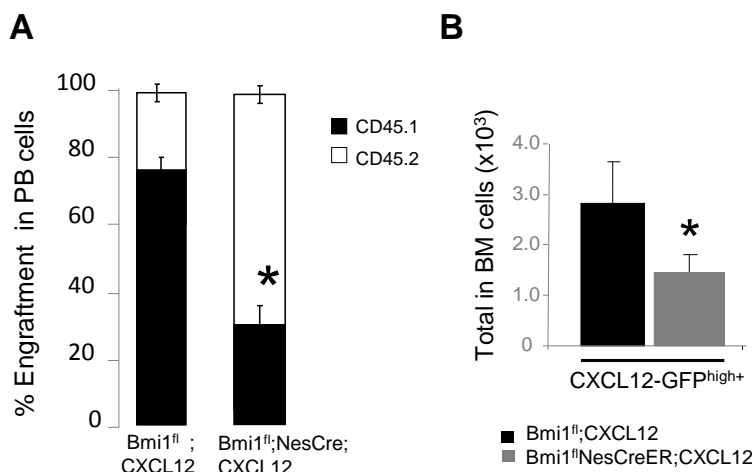


Figura 36: Análisis del trasplante inverso en ratones KO-Bmi1-Nes-Cxcl12^{GFP} y controles.

A) Repoblación de las células wt en ambos modelos recipientes según análisis de sangre periférica 4 semanas posttrasplante, para n=12 y siendo *p<0,05.

B) Células CAR totales en los animales recipientes por fémur 2 meses después del trasplante.

3. Evaluación de la represión de Cdkn2a por Bmi1 y sus efectos sobre el nicho hematopoyético.

En los dos modelos caracterizados, así como en resultados previamente publicados (Arranz L. et al., 2012), se observa un importante incremento de los activadores de senescencia $p16^{INK4a}$ y Arf tras la inactivación de Bmi1. Sugerimos por tanto que la función de Bmi1 en el nicho hematopoyético, puede estar mediada por la expresión de Cdkn2a, locus que codifica a las proteínas $p16^{INK4a}$ y Arf (Williams RT et al., 2008). Para comprobar esta hipótesis, generamos un ratón triple knockout para Bmi1, $p16^{INK4a}$ y Arf (TKO) en HSC utilizando el sistema Vavcre previamente descrito. En primer lugar se comprobó la doble delección por RT-PCR, y a su vez que no estaba acompañada de un mecanismo compensatorio por el que aumentase el resto de componentes de Polycomb (Fig. 37).

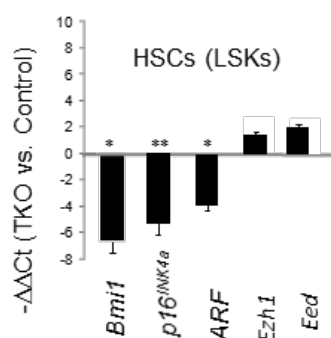


Figura 37: Expresión de Bmi1, Cdkn2a y otros genes en las HSC en el modelo TKO y sus controles.

Expresión de las proteínas Bmi1, $p16^{INK4a}$, Arf y otros miembros de Polycomb en las HSC del nuevo modelo $Bmi1^{f/f}Cdkn2a^{f/f}Vavcre^{tg/+}$ entre 8 y 12 semanas en médula ósea, aisladas por sus marcadores citométricos. Los resultados fueron normalizados por B-actina y se muestra el resultado de la expresión de cada gen con respecto a la de los controles (medias \pm SD; n=8, *p<0,05, **p<0,01).

Al analizar las poblaciones primitivas en médula, vimos que tanto las poblaciones de HSC como de MSC y EC no se veían afectadas en los animales TKO frente a los controles, hermanos de camada que no presentaban VavCre (Fig. 38A). Adicionalmente, se evaluó la funcionalidad in vitro de las MSC tanto en capacidad formadora de colonias como en sus niveles de diferenciación, no mostrando apenas diferencias entre genotipos en ninguno de los dos experimentos (Fig. 38B).

Estos resultados indican que mediante la eliminación de los genes $p16^{INK4a}$ y Arf, importantes dianas de Bmi1, somos capaces de revertir mayoritariamente el fenotipo que provoca la sobreexpresión de estos en un ambiente nulo para Bmi1, restaurando así la capacidad de repoblación de médula en HSC y limitando la tendencia adipogénica de las MSC en estos animales.

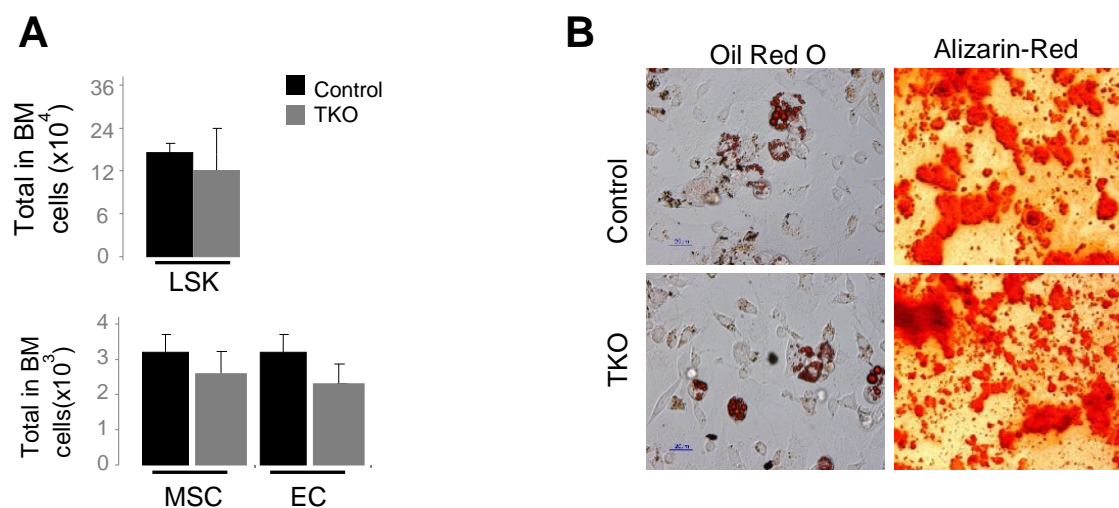


Figura 38: Análisis del nicho hematopoyético del modelo TKO y control.

A) Número de células totales por fémur según marcadores citométricos para las poblaciones LSK, MSC y EC. Los gráficos muestran medias \pm SD (n=8).

B) Diferenciación in vitro de las MSC de los animales TKO a adipocitos (izqda.) y osteoblastos (dcha) frente a sus controles.

Discusión

**Capítulo 1: Regulación epigenética de las HSC por la histona
metiltransferasa Ezh1.**

Debido a la homología que las subunidades del complejo PRC2 Ezh1 y Ezh2 comparten en su dominio SET catalítico (Abel KJ. et al, 1996), y a la importancia que el correcto balance de Ezh2 ha mostrado tener tanto en ESC como en células somáticas (Bernstein et al., 2006; Boyer et al., 2006), se hacía necesario ampliar el conocimiento de la acción de Ezh1 en sistemas tan importantes como el hematopoyético.

En esta tesis sugerimos que Ezh1 tiene una importante función como regulador homeostático de las HSC adultas, y que la actividad metiltransferasa puede estar coordinadamente distribuida entre Ezh1 y Ezh2 en las HSC jóvenes y envejecidas. Esta hipótesis surge porque al analizar los niveles de expresión de ambas proteínas en las HSC detectamos un importante incremento de Ezh1 a medida que envejece el organismo, así como un detrimento conforme aumenta el potencial de diferenciación de las HSC. Por el contrario, la expresión de Ezh2 se mantiene baja y constante en todas las subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos. Estos datos se obtuvieron tanto a nivel de ARNm como de proteína, y se corresponden con estudios previos realizados en HSC murinas y humanas (Mochizuki-Kassio et al., 2011; Wagner et al., 2009) así como en riñón murino (Margueron et al., 2008).

Hemos demostrado que Ezh1 es esencial para el correcto mantenimiento y regeneración de las HSC más primitivas en el ratón adulto. Esta hipótesis fue confirmada gracias a que generamos, por primera vez, un modelo de ratón que permite eliminar de manera condicional la expresión de Ezh1 mediante el sistema Cre-loxP. Con él dirigimos esa delección al sistema hematopoyético más primitivo mediante el uso del modelo VavCre (Georgiades et al., 2002; de Boer et al., 2003). Al analizar el fenotipo de estos modelos con una edad adulta de entre 12 y 20 semanas, encontramos una importante hipoplasia medular en ausencia de Ezh1, que se correlacionaba con una severa reducción en la fracción de las HSC, especialmente en las LT-HSC, base de la jerarquía hematopoyética. Estas células además, muestran una acusada deficiencia en su capacidad proliferativa, viéndose comprometidas tanto su capacidad de auto-renovación como su estado de quiescencia en comparación a las células de los controles, lo que nos indicaba que podría estar aumentada la diferenciación celular para mantener la homeostasis del sistema hematopoyético. No obstante, al estudiar las poblaciones celulares derivadas de ambos linajes linfóide y mieloide, descubrimos que no era esto lo

que estaba sucediendo. Por un lado, al analizar las células maduras mieloides no obtuvimos diferencias significativas entre los animales KO y control. Sin embargo, sí podemos afirmar que las HSC deficientes en *Ezh1* retrasan la diferenciación linfocitaria en estadios específicos de la hematopoyesis. Esto se corroboró mediante un análisis de maduración de las células B en médula ósea, realizado bajo la premisa de que los bazo *Ezh1*-KO mostraban un menor tamaño, así como una disminución respecto a los controles del número de centros germinales en los mismos. Los resultados obtenidos mostraron un desarrollo alterado de las células pro y pre-B así como de su fracción inmadura, lo cual generaba la consecuente disminución de linfocitos B maduros circulantes disminuyendo sus niveles tanto en bazo como en sangre periférica.

Hemos hallado una importante función protectora ejercida por *Ezh1* frente a la entrada en senescencia de las HSC. Esta acción ha sido demostrada al descartar distintas hipótesis sobre el destino final de las HSC deficientes en *Ezh1*. En primer lugar analizamos si el descenso de las mismas en los animales *Ezh1*-KO podría deberse a su entrada en apoptosis, pero los experimentos realizados no mostraron diferencias significativas frente a los controles. También determinamos que las células sin *Ezh1* mostraban un defecto en la proliferación, hipotetizando por tanto que podrían estar siguiendo una vía senescente en la que las células continúan siendo viables y mantienen cierta actividad metabólica pero llegan al fin de su capacidad replicativa y por tanto no se dividen (Collado et al, 2007). Esta vía explicaría el descenso cuantitativo que las HSC *Ezh1*-KO estaban experimentando frente a las de los controles así como su incapacidad para repoblar las médulas recipientes en los experimentos de trasplantes. Los experimentos realizados nos confirmaron que efectivamente las HSC estaban entrando en un estado senescente en ausencia de *Ezh1*. En primer lugar y mediante análisis histopatológicos, vimos que estas células presentaban una mayor expresión de marcadores de senescencia y daño del ADN, como *Cdkn2a*, γ -H2AX, *Dec1* o *Drc2* (Collado et al., 2005; Qian Y et al, 2008; Salama R. et al, 2014). También analizamos la actividad de la enzima β galactosidasa asociada a senescencia por dos vías: histología y citometría de flujo, desarrollando por primera vez esta técnica para su detección en la población de células madre hematopoyéticas. Ambas aproximaciones dieron cuenta de que efectivamente, la senescencia celular estaba aumentada considerablemente en la fracción de células LT-HSC deficientes en *Ezh1* frente a sus controles. El conjunto de resultados obtenidos de este set de experimentos, implica que la protección frente a la senescencia celular ejercida por *Ezh1*, es un factor crucial en el mantenimiento de las

reservas funcionales de HSC. Hemos observado que los defectos observados en las HSC Ezh1-KO están asociados a su baja tasa de auto-renovación con respecto a las HSC controles. Proponemos por tanto que este fenómeno es debido a los mecanismos de senescencia celular que ejercen los supresores tumorales controlados por Ezh1, más que a otros factores inductores de senescencia como el daño genómico o la erosión telomérica (Collado et al., 2007).

Determinamos que Ezh1 participa en la regulación de distintos genes implicados en el proceso de senescencia. Para ello, hemos realizado análisis de expresión génica en las poblaciones de HSC Ezh1-KO y control. Los genes diferencialmente menos expresados en las células KO para Ezh1, estaban ampliamente relacionados con la función de las HSC, como Gata3 o Runx1 (Buza-Vidas et al, 2011; Swiers et al., 2011); también en este grupo se encontraban genes involucrados en la diferenciación de las HSC hacia linfocitos como pueden ser Sfpi1, Flk2 o Mef2c (Hitomi et al. 1993; Hirayama F. et al., 1996) y genes relativos al ciclo celular, como Cdc6, Cdk1 o Mcm5, explicando este hecho por tanto la consecuente detención del crecimiento que encontramos en nuestras células (Kuilman et al., 2010). Por el contrario, un amplio set de genes relacionados con el proceso senescente se encontró altamente regulado en ausencia de Ezh1. Estos genes como IL-6, IL-7, GM-CSF y otros, están asociados a factores pro-inflamatorios asociados al fenotipo secretor SASP (Coppé et al., 2010).

La acción represora de Ezh1 sobre sus genes diana es debida a su capacidad para iniciar el proceso de compactación de la cromatina mediante la H3K27me1 y H3K27me2. Ambos residuos metilados han resultado ser producto de la acción de PRC2-Ezh1, siendo importantes intermediarios para la H3K27me3 mediada por el PRC2-Ezh2 y el consecuente silenciamiento génico. Este hallazgo se produjo gracias a experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, que fueron realizados para determinar con detalle los mecanismos por los que Ezh1 regulaba a los genes previamente identificados. Los resultados obtenidos revelaron que selectivamente se reprimía la expresión de genes como Runx1 o Cdc6 en las células KO para Ezh1, ya que las regiones promotoras de estos genes mostraban un importante y significativo aumento de las marcas H3K27me2 y H3K27me1 frente a las células control, mientras que no encontramos diferencias con respecto a los controles en cuanto a la H3K27me3. Por el contrario, en los genes que aparecían sobreexpresados en ausencia de Ezh1, como Bmp2 o Igfbp3, también relacionados con funciones secretoras asociadas a senescencia (Kaneda et al., 2011; Coppé et al., 2010) o p16INK4a, observamos una disminución de

las marcas mono y dimetilación de la H3K27 en las células Ezh1-KO, viéndose a su vez afectada la trimetilación, presentando las tres marcas unos valores significativamente más bajos que en los controles. Adicionalmente, en estos genes, especialmente p16INK4a, también encontramos un incremento de la marca activadora H3K4me3, lo cual nos indica que ante la ausencia de Ezh1, este gen se encuentra absolutamente desregulado, estableciendo así a Cdkn2a, locus que lo codifica junto a p19ARF, como una diana directa de nuestra histonmetiltransferasa Ezh1.

También hemos demostrado en el transcurso de la tesis que tanto el papel protector de Ezh1 en las HSC frente a los procesos de senescencia celular como la regulación ejercida sobre el mantenimiento de las HSC, radican principalmente en su acción represora sobre el locus Cdkn2a. El incremento de su expresión ha sido ampliamente definido como uno de los principales factores que inducen a la senescencia celular (Collado et al., 2007). Este hecho unido a que nuestros datos confirman la represión de este locus por Ezh1 nos sugirieron generar un modelo murino en el que eliminamos p16INK4a y ARF de un contexto hematopoyético sin Ezh1 (TKO). En este modelo vimos que se recuperaba mayoritariamente el fenotipo de las HSC Ezh1-KO, mostrando unos valores tanto de número total como de frecuencias de las HSC sin diferencias significativas con los valores del control. Estos animales también presentaban contajes normales de todos los tipos celulares de sangre periférica, así como de las células diferenciadas en timo y bazo. Por otro lado, a la hora de estudiar la funcionalidad de las HSC-TKO, vimos que repoblaban las médulas de recipientes irradiados sin ninguna diferencia significativa al modo en que lo hacían sus controles. A su vez, las LSK de este nuevo modelo tampoco presentaban un incremento significativo de la actividad senescente de la enzima β galactosidasa, confirmando así nuestra hipótesis de que la desregulación del locus Cdkn2a era la causa mayoritaria de la senescencia encontrada en las HSC deficitarias en Ezh1, no descartando sin embargo otros mecanismos.

Tanto Ezh1 como Ezh2, están implicadas en los procesos de H3K27me, H3K27me2 y H3K27me3, sin embargo, cada forma metilada parece ser funcionalmente distinta. En este trabajo hemos demostrado que la acción catalítica del complejo PRC2-Ezh1 consiste principalmente en catalizar la H3K27me, así como la H3K27me2 en menor medida, dando así lugar a los sustratos imprescindibles e intermediarios para que se produzca la marca H3K27me3, en su mayor parte dada por PRC2-Ezh2 y última responsable del silenciamiento génico. Así lo hemos comprobado en los experimentos

de inmunoprecipitación de la cromatina sobre dianas tan importantes de Ezh1 como p16^{INK4a}. En sus regiones promotoras tanto la H3K27me como la H3K27me2 se encontraban prácticamente ausentes en las HSC Ezh1-KO, lo cual generaba una importante sobreexpresión del mismo en ausencia de Ezh1 al carecer de estas marcas represoras. Este tema ha ganado especial atención en el contexto de la diferenciación de las ESC (Margueron et al., 2011). Aún queda mucho por conocer sobre la regulación de H3K27me por el PRC2, pudiendo radicar la respuesta a su diversidad en la particular composición proteica del complejo en cada caso. Por ejemplo, se ha encontrado que Suz12 es esencial para la H3K27me3, pero dispensable para H3K27me1 (Pasini et al., 2004), al igual que la proteína Phf1 es capaz de estimular la H3K27me3 in vivo e in vitro (Cao et al., 2008).

El conjunto de todos estos resultados subraya la importancia de los cambios epigenéticos mediados por el PRC2 en la regulación de la barrera fisiológica entre el bloqueo de la senescencia y las transformaciones oncogénicas. Existen abundantes evidencias que indican que la senescencia celular es una protección fisiológica natural frente al desarrollo tumoral, por lo tanto, el compromiso terapéutico ante este fenómeno podría presentar una valiosa estrategia de tratamiento frente al cáncer. Esto hace que entender los mecanismos moleculares por los que Ezh1 afecta al destino de las células madre nos provea de nuevos conocimientos de la biología de las HSC y que incrementemente el entendimiento de la transformación leucémica, con el consiguiente potencial para facilitar su erradicación.

Cabría estudiar la influencia de Ezh1 en algunos procesos tumorales así como la posible existencia de mutaciones en su secuencia, bajo los precedentes de que existen patologías relacionadas con mutaciones de Ezh2. Estas mutaciones aumentan su función de di- y trimetilación, como linfomas de células B, síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda (Sneeringer et al., 2011). Por el contrario, existen otros estudios que correlacionan la pérdida de función de Ezh2 con neoplasias mieloides, indicando que puede actuar como supresor tumoral (Nikolosky et al., 2010; Ernst et al., 2010). A esta divergencia se le atribuye ser dependiente del tipo de patología así como del tipo celular del que se trate (Volkel et al., 2015).

En cualquier caso, el mantenimiento de los niveles correctos de Ezh1 y Ezh2 es crucial para evitar ciertos desórdenes hematológicos. Buen ejemplo de ello podría ser el caso de la leucemia MLL-AF9, responsable de aproximadamente el 70 % de los casos de leucemias agudas infantiles mieloides o linfoides y de entre el 7 y el 10 % de los

mismos casos en adultos, relacionadas con una baja tasa de supervivencia (Xu et al., 2015). En modelos animales que presentan esta fusión causante de leucemias, se ha descrito que la eliminación de Bmi1 evita la aparición de la patología debido a la entrada en senescencia de las HSC mediada por la no represión de p16^{INK4a} y p19^{ARF} (Smith et al., 2011). Dado que en esta tesis hemos demostrado una importante función represora de Ezh1 sobre las mismas proteínas, se hace interesante profundizar en el estudio de su papel en esta patología. Ya algunas publicaciones sugieren que Ezh1 presenta una acción complementaria a Ezh2 en cuanto su generación (Neff et al., 2012; Shi et al., 2013) a causa de la no abolición de H3K27me3 detectada en ausencia de Ezh2. Basándose en esta actividad enzimática, se ha descrito el compuesto UNC1999, que podría tener una importante relevancia farmacológica frente a tales procesos tumorales relacionados con Ezh1 y Ezh2 (Konze et al., 2013). Esta molécula actúa inhibiendo a ambas enzimas mediante la competición con el sustrato SAM, que les suministra los grupos metilo necesarios para su acción metiltransferasa. La importancia de este tipo de fármacos, radica en la supresión de las metilaciones en la H3K27 de dianas como Cdkn2a, evitando así la represión de estos supresores tumorales de forma absoluta, frente a otras sustancias que ya se habían descrito para inhibir sólo a Ezh2 (Xu et al., 2015). De esta forma se evita la redundancia funcional que pueden presentar ambas proteínas.

Una vez obtenidos estos resultados sobre la regulación de HSC por Ezh1, junto a los antecedentes de su proteína homóloga Ezh2, sería interesante como proyecto futuro realizar un abordaje más completo eliminando tanto Ezh1 como Ezh2 del contexto de las HSC adultas. En estos modelos, podremos ver las consecuencias de la total ausencia de histonmetiltransferasas delecionando por primera vez las dos proteínas in vivo. A su vez, también podremos identificar dianas comunes con significancia relevante en los desórdenes hematopoyéticos que pudieran originarse.

Capítulo 2: Regulación de las células madre hematopoyéticas y su nicho mediante el gen *Bmi1*.

La importancia de *Bmi1* como regulador de las HSC había sido ampliamente descrita con modelos murinos que presentaban una delección constitutiva para este gen desde línea germinal, (Jacobs et al., 1999; Park et al., 2003). En estos modelos, tras su nacimiento se obtuvieron tanto defectos hematológicos como anomalías neurológicas o esqueléticas (Van der Lugt et al., 1994) y presentaban una tasa de supervivencia muy baja tras el destete, con lo cual, aunque pareciera haber un defecto en las HSC, se dificultaba el estudio en profundidad de las mismas. No fue hasta 2012, cuando un modelo condicionalmente knock-out para *Bmi1* generado en nuestro laboratorio, nos permitió una correcta aproximación al estudio de las consecuencias de su eliminación exclusivamente en el sistema hematopoyético. Este modelo se cruzó con ratones transgénicos Vavcre (Georgiades et al., 2002; de Boer et al., 2003) para inducir su eliminación en el contexto de las HSC más primitivas (Arranz et al., 2012). Gracias a esta herramienta, se demostró que efectivamente, *Bmi1* puede ser considerado un importante regulador del mantenimiento y función de las HSC.

En los últimos años se ha investigado mucho el importante papel regulador que ejercen las distintas poblaciones del nicho hematopoyético sobre las HSC, su mantenimiento y características. El nicho hematopoyético es un entramado tridimensional donde se dan factores tanto intra como extracelulares que regulan la función de las HSC. Existen estudios que demuestran que algunas células maduras hematopoyéticas como macrófagos (Chow et al., 2011; Winckle et al., 2011), o células monocíticas (Christopher et al., 2011) son capaces de alterar la función del nicho. Estos hechos sumados a la posición jerárquica que las HSC ocupan en el sistema hematopoyético nos hacían preguntarnos si ellas a su vez presentan un efecto regulador sobre la función y mantenimiento de su propio nicho. A su vez, dada la importancia de *Bmi1* como regulador de las HSC, hipotetizamos que podría formar parte de un mecanismo general para la regulación epigenética del mantenimiento y función de las células del nicho.

Nuestros resultados han mostrado en primer lugar una importante contribución de *Bmi1* en las principales poblaciones celulares presentes en médula que componen el nicho hematopoyético. Las HSC resultaron ser su mayor reservorio en médula, seguidas

de las células CAR y posteriormente MSC-Nes+. Ambas presentaban una importante expresión de este gen en comparación al total de células de la médula ósea

La presencia de las HSC es necesaria para el mantenimiento de las células que forman el nicho hematopoyético (Pinho et al., 2013). El microambiente de las HSC en la médula ósea se ve fuertemente afectado por la pérdida de las mismas provocada por la eliminación de Bmi1. Para evaluar estos efectos hemos utilizado el modelo condicional previamente descrito (Arranz et al 2012), detectando que las poblaciones celulares del nicho más afectadas por la disminución de HSC que se origina en ausencia de Bmi1 son las células CAR y las MSC-Nes+. Las células endoteliales presentan una bajada en su número total sin llegar a ser significativa, con lo que podemos decir que no se ven afectadas por este descenso en las HSC, al igual que ocurre en cuanto a la población de osteoblastos.

Sugerimos que las células MSC necesitan la presencia de las HSC para un correcto mantenimiento y función. Además de estar cuantitativamente muy reducidas ante la bajada de HSC provocada por la ausencia de Bmi1, *in vitro* hemos observado que tanto las MSC-Nes+ como las células CAR presentan una baja capacidad formadora de colonias, dándonos cuenta de que también este aspecto funcional de las MSC se veía perjudicado ante la ausencia de Bmi1 en las HSC. A su vez, mediante la realización de trasplantes inversos, hemos visto que los animales que previamente habían estado afectados por el bajo número de HSC, no son capaces de ser repoblados como los wt a largo plazo, mostrando una recuperación transitoria de los recipientes irradiados solamente durante las primeras ocho semanas.

En ausencia de Bmi1 en el sistema hematopoyético primitivo, las MSC presentan una tendencia de diferenciación favorable hacia adipocitos. Este hecho se ha visto corroborado tanto por los experimentos realizados *in vitro* como por la observación de las médulas en secciones histológicas de H&E. Por el contrario, su capacidad de formación de osteoblastos no se vio afectada.

Hemos establecido que también la pérdida de Bmi1 en las células MSC-Nes+, afecta de forma severa a las HSC más primitivas, existiendo una bajada muy acusada en los subconjuntos de LT-HSC y células LSK SLAM+ de los mismos. De nuevo las células endoteliales y osteoblastos no se vieron afectados con esta delección, de forma que las principales poblaciones reguladoras del nicho hematopoyético que requieren de la acción de Bmi1 son las HSC en sí mismas y las células MSC. En este caso, las células mesenquimales obtenidas para experimentos de diferenciación *in vitro* también

han mostrado una importante determinación hacia la diferenciación adipogénica, corroborando el fenotipo que hemos detectado en las secciones histológicas al igual que ocurría con la eliminación de *Bmi1* en las HSC.

Dados los antecedentes previos de *Bmi1* en el sistema hematopoyético, así como los resultados obtenidos, hipotetizamos que su papel regulador tanto en las HSC como en las MSC viene dado en parte por su acción represora sobre el locus *Cdkn2a*, necesaria para una correcta función y mantenimiento de la hematopoyesis. Para abordar esta hipótesis establecimos un modelo en el que tanto *Bmi1* como *Cdkn2a* se eliminaban de las HSC. Los resultados obtenidos en estos animales, revelaron que efectivamente, la eliminación de ambos reestablecía la cantidad de células madre tanto hematopoyéticas como mesenquimales, recuperando ambas su funcionalidad. Esto fue comprobado mediante ensayos de trasplantes en el primer caso y de diferenciaciones y capacidad formadora de colonias en el segundo.

Durante los últimos años, las células madre hematopoyéticas han adquirido una vital importancia debido a sus múltiples aplicaciones en clínica, con una especial atención a los trasplantes de médula ósea, para lo cual, el nicho en el que se encuentran juega un papel fundamental. Estos procedimientos se utilizan en varios tipos de cáncer de células sanguíneas, con el objetivo de poder suministrar al paciente altas dosis de quimioterapia o radioterapia que puedan abolir las células tumorales. Su principal problema es que son tratamientos muy agresivos, con lo que acabarán destruyendo también las células madre hematopoyéticas del paciente, siendo necesario repoblar su médula con HSC sanas para reestablecer tanto las poblaciones de la sangre como gran parte del sistema inmunitario. Al recibir estos tratamientos, los pacientes tienden a generar una mayor cantidad de adipocitos intramedulares, impidiendo así la correcta repoblación de la médula por las HSC procedentes del donador. Además se ha comprobado que las áreas menos grasas dentro de la médula, favorecen la hematopoyesis al contrario que aquellas con mayor cantidad de adipocitos, donde se observa una disminución de LT-HSC y ST-HSC (Bethel et al., 2013). También se ha descrito que en médulas tratadas con fármacos que inhiben o reducen la adipogénesis, las HSC han sido capaces de incrementar su capacidad de repoblación de las mismas (Naveiras et al., 2009). Por tanto, comprendiendo con más precisión los mecanismos por los que la falta de *Bmi1* incrementa esta adipogénesis medular, *Bmi1* podría convertirse en un interesante objetivo a tener en cuenta en posibles terapias génicas para mejorar estos procesos. Para esto sería necesario un estudio más amplio de la expresión

génica de nuestros modelos: identificar los principales genes diana de Bmi1 en las poblaciones de HSC y de MSC, y analizar detalladamente las marcas epigenéticas presentes en los mismos.

Conclusiones

1. La expresión de la metiltransferasa Ezh1 se ve incrementada en el conjunto de HSC adultas durante su envejecimiento, este aumento de expresión es más significativo en las LT-HSC.
2. Se ha generado un modelo condicional knock-out para Ezh1, mediante la adición de secuencias loxP en los exones que codifican el dominio SET catalítico, con el objeto de favorecer su eliminación dirigida en nuestro sistema de interés.
3. La delección de Ezh1 en HSC primitivas provoca una severa hipoplasia en médula ósea de ratones adultos así como una pérdida de funcionalidad de las mismas a la hora de repoblar la médula de recipientes letalmente irradiados.
4. La deficiencia de Ezh1 en HSC adultas, incrementa la senescencia celular provocada por la acusada desregulación del locus Cdkn2a.
5. La función de Ezh1 es requerida para la diferenciación y maduración medular de las células B.
6. En el sistema hematopoyético y su nicho, Bmi1 se expresa por este orden en las HSC, células CAR, EC, MSC-Nes+ y por último OBC.
7. Hemos utilizado un modelo condicionalmente knock-out para Bmi1 previamente generado en nuestro laboratorio para eliminar esta proteína de nuestras poblaciones celulares de interés mediante el uso de los sistemas VavCre y Nestin^{ERT}Cre.
8. La presencia de Bmi1 en HSC es requerida para la correcta funcionalidad de las mismas y de la población de MSC y viceversa, pero no parece ser necesaria para las poblaciones medulares de células endoteliales ni osteoblastos.
9. La ausencia de Bmi1 tanto en HSC como en MSC, genera una diferenciación de las MSC de médula favorable a adipogénesis.
10. La represión directa que Bmi1 ejerce sobre el locus Cdkn2a, parece ser la responsable de una estrecha y recíproca regulación entre HSC y MSC.

Bibliografía

- Abel, K. J., et al. (1996), 'Characterization of EZH1, a human homolog of Drosophila Enhancer of zeste near BRCA1', *Genomics*, 37 (2), 161-71.
- Akala, O. O. and Clarke, M. F. (2006), 'Hematopoietic stem cell self-renewal', *Curr Opin Genet Dev*, 16 (5), 496-501.
- Arranz, L., et al. (2012), 'Bmi1 is critical to prevent Ikaros-mediated lymphoid priming in hematopoietic stem cells', *Cell Cycle*, 11 (1), 65-78.
- Bardot, E. S., et al. (2013), 'Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells', *The EMBO journal*, 32 (14), 1990-2000.
- Berezovska, O. P., et al. (2006), 'Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer', *Cell cycle*, 5 (16), 1886-901.
- Berger, S. L. (2007), 'The complex language of chromatin regulation during transcription', *Nature*, 447 (7143), 407-12.
- Bernstein, B. E., et al. (2006), 'A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells', *Cell*, 125 (2), 315-26.
- Bethel, M., et al. (2013), 'The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis', *Current osteoporosis reports*, 11 (2), 99-106.
- Blackledge, N. P., et al. (2014), 'Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation', *Cell*, 157 (6), 1445-59.
- Boyer, L. A., et al. (2006), 'Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells', *Nature*, 441 (7091), 349-53.
- Bracken, A. P., et al. (2006), 'Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions', *Genes Dev*, 20 (9), 1123-36.
- Bracken, A. P., et al. (2007), 'The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells', *Genes Dev*, 21 (5), 525-30.
- Bruggeman, S. W., et al. (2007), 'Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma', *Cancer Cell*, 12 (4), 328-41.

- Burns, K. A., et al. (2007), 'Nestin-CreER mice reveal DNA synthesis by nonapoptotic neurons following cerebral ischemia hypoxia', *Cerebral cortex*, 17 (11), 2585-92.
- Buza-Vidas, N., et al. (2011), 'GATA3 is redundant for maintenance and self-renewal of hematopoietic stem cells', *Blood*, 118 (5), 1291-3.
- Calvi, L. M., et al. (2003), 'Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche', *Nature*, 425 (6960), 841-6.
- Cao, R., et al. (2008), 'Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing', *Molecular and cellular biology*, 28 (5), 1862-72.
- Collado, M., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2007), 'Cellular senescence in cancer and aging', *Cell*, 130 (2), 223-33.
- Collado, M., et al. (2005), 'Tumour biology: senescence in premalignant tumours', *Nature*, 436 (7051), 642.
- Coppe, J. P., et al. (2010), 'The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression', *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118.
- Cullen, S. M., et al. (2014), 'Hematopoietic stem cell development: an epigenetic journey', *Current topics in developmental biology*, 107, 39-75.
- Chagraoui, J., et al. (2006), 'E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells', *Genes Dev*, 20 (15), 2110-20.
- Chambers, S. M., et al. (2007a), 'Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation', *PLoS Biol*, 5 (8), e201.
- Chambers, S. M., et al. (2007b), 'Hematopoietic fingerprints: an expression database of stem cells and their progeny', *Cell Stem Cell*, 1 (5), 578-91.
- Chow, A., et al. (2011), 'Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche', *J Exp Med*, 208 (2), 261-71.
- Christopher, M. J., et al. (2011), 'Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice', *J Exp Med*, 208 (2), 251-60.

- Daley, G. Q. (2012), 'The promise and perils of stem cell therapeutics', *Cell Stem Cell*, 10 (6), 740-9.
- de Boer, J., et al. (2003), 'Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre', *Eur J Immunol*, 33 (2), 314-25.
- Debacq-Chainiaux, F., et al. (2009), 'Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo', *Nat Protoc*, 4 (12), 1798-806.
- Dieguez-Hurtado, R., et al. (2010), 'A Cre-reporter transgenic mouse expressing the far-red fluorescent protein Katushka', *Genesis*, 49 (1), 36-45.
- Ding, L. and Morrison, S. J. (2013), 'Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches', *Nature*, 495 (7440), 231-5.
- Ding, L., et al. (2012a), 'Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells', *Nature*, 481 (7382), 457-62.
- Ding, X., et al. (2012b), 'Polycomb group protein Bmi1 promotes hematopoietic cell development from embryonic stem cells', *Stem Cells Dev*, 21 (1), 121-32.
- Douglas, D., et al. (2008), 'BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression', *Cancer research*, 68 (16), 6507-15.
- Ellis, S. L. and Nilsson, S. K. (2012), 'The location and cellular composition of the hemopoietic stem cell niche', *Cytotherapy*, 14 (2), 135-43.
- Ernst, T., et al. (2010), 'Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders', *Nat Genet*, 42 (8), 722-6.
- Eskeland, R., et al. (2010), 'Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination', *Molecular cell*, 38 (3), 452-64.
- Ezhkova, E., et al. (2011), 'EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair', *Genes Dev*, 25 (5), 485-98.
- Forsberg, E. C., et al. (2010), 'Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells', *PLoS One*, 5 (1), e8785.

- Gao, Z., et al. (2012), 'PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes', *Molecular cell*, 45 (3), 344-56.
- Garcia-Cao, I., et al. (2002), '"Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally', *Embo J*, 21 (22), 6225-35.
- Georgiades, P., et al. (2002), 'VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages', *Genesis*, 34 (4), 251-6.
- Grote, D., et al. (2015), 'E4F1 Is a Master Regulator of CHK1-Mediated Functions', *Cell reports*, 11 (2), 210-9.
- Haupt, Y., et al. (1993), 'bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis', *Oncogene*, 8 (11), 3161-4.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961), 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental cell research*, 25, 585-621.
- Herrera-Merchan, A., et al. (2012(a)), 'Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease', *Nat Commun*, 3, 623.
- Hirayama, F. and Ogawa, M. (1996), 'Cytokine regulation of early lymphohematopoietic development', *Stem Cells*, 14 (4), 369-75.
- Hitomi, Y., Yamada, T., and Oikawa, T. (1993), 'Extinction of expression of the PU.1/Sfpi-1 putative oncogene encoding a B-cell- and macrophage-specific transcription factor in somatic cell hybrids', *Cancer research*, 53 (23), 5759-65.
- Hooper, A. T., et al. (2007), 'Does N-cadherin regulate interaction of hematopoietic stem cells with their niches?', *Cell Stem Cell*, 1 (2), 127-9.
- Hosen, R. S. (2007), 'The case report of staphylococcal scalded skin syndrome', *South Dakota medicine : the journal of the South Dakota State Medical Association*, 60 (5), 186; author reply 86.
- Huber, G. F., et al. (2011), 'Expression patterns of Bmi-1 and p16 significantly correlate with overall, disease-specific, and recurrence-free survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma', *Cancer*, 117 (20), 4659-70.

- Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M, Nakauchi H. (2004), 'Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1.', *Immunity*, 21 (6), 843-51.
- Iwama, A., et al. (2005), 'Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal by polycomb group genes', *Int J Hematol*, 81 (4), 294-300.
- Jacobs, J. J., et al. (1999), 'The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus', *Nature*, 397 (6715), 164-8.
- Jovanovic, J., et al. (2010), 'The epigenetics of breast cancer', *Molecular oncology*, 4 (3), 242-54.
- Kaneda, A., et al. (2011), 'Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence', *PLoS Genet*, 7 (11), e1002359.
- Kiel, M. J., et al. (2005), 'SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells', *Cell*, 121 (7), 1109-21.
- Kobayashi, H., et al. (2010), 'Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells', *Nature cell biology*, 12 (11), 1046-56.
- Konze, K. D., et al. (2013), 'An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1', *ACS chemical biology*, 8 (6), 1324-34.
- Kuilman, T., et al. (2010), 'The essence of senescence', *Genes Dev*, 24 (22), 2463-79.
- Lanzuolo, C. and Orlando, V. (2012), 'Memories from the polycomb group proteins', *Annual review of genetics*, 46, 561-89.
- Le Cam, L., et al. (2006), 'E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation', *Cell*, 127 (4), 775-88.
- Lessard, J. and Sauvageau, G. (2003), 'Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells', *Nature*, 423 (6937), 255-60.

- Lewis, E. B. (1978), 'A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*', *Nature*, 276 (5688), 565-70.
- Li, G., et al. (2013), 'Altered expression of polycomb group genes in glioblastoma multiforme', *PLoS One*, 8 (11), e80970.
- Li, Z., et al. (2006), 'Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex', *The Journal of biological chemistry*, 281 (29), 20643-9.
- Liu, Y., et al. (2015), 'Histone lysine methyltransferase Ezh1 promotes TLR-triggered inflammatory cytokine production by suppressing Tollip', *Journal of immunology*, 194 (6), 2838-46.
- Lo Celso, C., Wu, J. W., and Lin, C. P. (2009), 'In vivo imaging of hematopoietic stem cells and their microenvironment', *Journal of biophotonics*, 2 (11), 619-31.
- Lukacs, R. U., et al. (2010), 'Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation', *Cell stem cell*, 7 (6), 682-93.
- Ma, R. G., et al. (2014), 'Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins', *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 15 (5), 412-28.
- Majewski, I. J., et al. (2008), 'Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity', *PLoS Biol*, 6 (4), e93.
- Margueron, R. and Reinberg, D. (2011), 'The Polycomb complex PRC2 and its mark in life', *Nature*, 469 (7330), 343-9.
- Mazo, I. B., Massberg, S., and von Andrian, U. H. (2011), 'Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking', *Trends in immunology*, 32 (10), 493-503.
- Mendez-Ferrer, S., et al. (2010b), 'Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche', *Nature*, 466 (7308), 829-34.
- Meng, S., et al. (2010), 'Identification and characterization of Bmi-1-responding element within the human p16 promoter', *The Journal of biological chemistry*, 285 (43), 33219-29.
- Merkerova, M., et al. (2007), 'Bmi-1 over-expression plays a secondary role in chronic myeloid leukemia transformation', *Leukemia & lymphoma*, 48 (4), 793-801.

- Mochizuki-Kashio, M., et al. (2011), 'Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells', *Blood*, 118 (25), 6553-61.
- Molofsky, A. V., et al. (2003), 'Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation', *Nature*, 425 (6961), 962-7.
- Morin, R. D., et al. (2010), 'Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin', *Nat Genet*, 42 (2), 181-5.
- Morrison, S. J. and Scadden, D. T. (2014), 'The bone marrow niche for haematopoietic stem cells', *Nature*, 505 (7483), 327-34.
- Naveiras, O., et al. (2009), 'Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment', *Nature*, 460 (7252), 259-63.
- Neff, T., et al. (2012), 'Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (13), 5028-33.
- Ng, S. Y., et al. (2009), 'Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells', *Immunity*, 30 (4), 493-507.
- Nikoloski, G., et al. (2010), 'Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes', *Nat Genet*, 42 (8), 665-7.
- Oguro, H., et al. (2010), 'Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1', *Cell Stem Cell*, 6 (3), 279-86.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2008), 'Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology', *Cell*, 132 (4), 631-44.
- Park, I. K., et al. (2003), 'Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells', *Nature*, 423 (6937), 302-5.
- Pasini, D., et al. (2004), 'Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity', *EMBO J*, 23 (20), 4061-71.

- Peschansky, V. J. and Wahlestedt, C. (2014), 'Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation', *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*, 9 (1), 3-12.
- Pinho, S., et al. (2013), 'PDGFRalpha and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion', *J Exp Med*, 210 (7), 1351-67.
- Qian, C. and Zhou, M. M. (2006), 'SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 63 (23), 2755-63.
- Qian, Y., et al. (2008), 'DEC1, a basic helix-loop-helix transcription factor and a novel target gene of the p53 family, mediates p53-dependent premature senescence', *The Journal of biological chemistry*, 283 (5), 2896-905.
- Rieger, M. A. and Schroeder, T. (2012), 'Hematopoiesis', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4 (12).
- Salama, R., et al. (2014), 'Cellular senescence and its effector programs', *Genes Dev*, 28 (2), 99-114.
- Sangiorgi, E. and Capecchi, M. R. (2008), 'Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells', *Nat Genet*, 40 (7), 915-20.
- Sangiorgi, E. and Capecchi, M. R. (2009), 'Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (17), 7101-6.
- Sashida, G. and Iwama, A. (2012), 'Epigenetic regulation of hematopoiesis', *International journal of hematology*, 96 (4), 405-12.
- Saudy, N. S., et al. (2014), 'BMI1 gene expression in myeloid leukemias and its impact on prognosis', *Blood cells, molecules & diseases*, 53 (4), 194-8.
- Schepers, K., et al. (2013), 'Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche', *Cell Stem Cell*, 13 (3), 285-99.

- Schoeftner, S., et al. (2006), 'Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing', *The EMBO journal*, 25 (13), 3110-22.
- Schuettengruber, B., et al. (2011), 'Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12 (12), 799-814.
- Schuettengruber, B., et al. (2007), 'Genome regulation by polycomb and trithorax proteins', *Cell*, 128 (4), 735-45.
- Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V. (2014), 'Ruled by ubiquitylation: a new order for polycomb recruitment', *Cell reports*, 8 (2), 321-5.
- Seita, J. and Weissman, I. L. (2010), 'Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation', *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2 (6), 640-53.
- Serrano, M., et al. (1997), 'Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a', *Cell*, 88 (5), 593-602.
- Shen, X., et al. (2008), 'EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency', *Mol Cell*, 32 (4), 491-502.
- Shi, J., et al. (2013), 'The Polycomb complex PRC2 supports aberrant self-renewal in a mouse model of MLL-AF9;Nras(G12D) acute myeloid leukemia', *Oncogene*, 32 (7), 930-8.
- Siddique, H. R. and Saleem, M. (2012), 'Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences', *Stem Cells*, 30 (3), 372-8.
- Simboeck, E., et al. (2011), 'Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus', *Biochemical pharmacology*, 82 (10), 1361-70.
- Siminovitch, L., Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1964), 'Decline in Colony-Forming Ability of Marrow Cells Subjected to Serial Transplantation into Irradiated Mice', *J. Cell Physiol.*, 64, 23-31.

- Simon, J. A. and Kingston, R. E. (2009), 'Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10 (10), 697-708.
- Smith, L. L., et al. (2011), 'Functional crosstalk between Bmi1 and MLL/Hoxa9 axis in establishment of normal hematopoietic and leukemic stem cells', *Cell Stem Cell*, 8 (6), 649-62.
- Sneeringer, C. J., et al. (2011), 'Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (49), 20980-5.
- Steffen, P. A. and Ringrose, L. (2014), 'What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15 (5), 340-56.
- Stojic, L., et al. (2011), 'Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells', *Epigenetics & chromatin*, 4, 16.
- Su, I. H., et al. (2003), 'Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement', *Nat Immunol*, 4 (2), 124-31.
- Sugiyama, T. and Nagasawa, T. (2012), 'Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells', *Inflammation & allergy drug targets*, 11 (3), 201-6.
- Sugiyama, T., et al. (2006), 'Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches', *Immunity*, 25 (6), 977-88.
- Swiers, G., de Bruijn, M., and Speck, N. A. (2010), 'Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1', *Int J Dev Biol*, 54 (6-7), 1151-63.
- Thomas, E. D. (2005), 'Bone marrow transplantation from the personal viewpoint', *International journal of hematology*, 81 (2), 89-93.
- van der Lugt, N. M., et al. (1994), 'Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene', *Genes Dev*, 8 (7), 757-69.

- van Lohuizen, M., et al. (1991), 'Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging', *Cell*, 65 (5), 737-52.
- Vidal, M. (2009), 'Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression', *The International journal of developmental biology*, 53 (2-3), 355-70.
- Vizan, P., et al. (2015), 'Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease', *The FEBS journal*, 282 (9), 1723-35.
- Volkel, P., et al. (2015), 'Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics', *American journal of translational research*, 7 (2), 175-93.
- Voncken, J. W., et al. (2003), 'Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (5), 2468-73.
- Wagner, W., et al. (2009), 'Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells', *PLoS One*, 4 (6), e5846.
- Weng, M. K., et al. (2012), 'Extensive transcriptional regulation of chromatin modifiers during human neurodevelopment', *PLoS One*, 7 (5), e36708.
- Williams, R. T. and Sherr, C. J. (2008), 'The INK4-ARF (CDKN2A/B) locus in hematopoiesis and BCR-ABL-induced leukemias', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, 461-7.
- Winkler, I. G., et al. (2010), 'Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs', *Blood*, 116 (23), 4815-28.
- Xu, B., et al. (2015), 'Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL-rearranged leukemia', *Blood*, 125 (2), 346-57.
- Xu, C. R., et al. (2009), 'Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis', *Molecular cancer research : MCR*, 7 (12), 1937-45.
- Yamazaki, S., et al. (2011), 'Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche', *Cell*, 147 (5), 1146-58.

Zhang, J., et al. (2003), 'Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size', *Nature*, 425 (6960), 836-41.

Zhao, J., et al. (2014), 'Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 190945.

Zhou, B. O., et al. (2014), 'Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow', *Cell Stem Cell*, 15 (2), 154-68.

Anexos

Anexo I:

Artículos que forman parte de
la tesis

